

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



135

(51) 国際特許分類6 C12N 15/52, C12P 23/00, C12N 9/00, 9/10, A01N 57/18, C12Q 1/25, 1/48	A1	(11) 国際公開番号 WO99/53071
		(43) 国際公開日 1999年10月21日(21.10.99)

(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01987	尾崎明夫(OZAKI, Akio)[JP/JP] 〒194-0021 東京都町田市中町3-9-13 Tokyo, (JP)
(22) 国際出願日 1999年4月14日(14.04.99)	瀬戸治男(SETO, Haruo)[JP/JP] 〒192-0902 東京都八王子市上野町100-5 Tokyo, (JP)
(30) 優先権データ 特願平10/103101 1998年4月14日(14.04.98) JP 特願平10/221910 1998年8月5日(05.08.98) JP 特願平11/35739 1999年2月15日(15.02.99) JP	葛山智久(KUZUYAMA, Tomohisa)[JP/JP] 〒155-0032 東京都世田谷区代沢2-11-5 Tokyo, (JP) 高橋俊二(TAKAHASHI, Shunji)[JP/JP] 〒260-0851 千葉県千葉市中央区矢作町641 グリーンハウスB棟102号 Chiba, (JP)
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)(JP/JP) 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)	(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo, (JP)
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 三宅浩一郎(MIYAKE, Koichiro)[JP/JP] 〒194-0021 東京都町田市中町3-9-10 協和アパートC-3号 Tokyo, (JP) 橋本信一(HASHIMOTO, Shinichi)[JP/JP] 〒228-0802 神奈川県相模原市上鶴間2896-1 LSP町田1203 Kanagawa, (JP) 本山裕章(MOTOYAMA, Hiroaki)[JP/JP] 〒225-0024 神奈川県横浜市中区青葉区市ヶ尾町5-1-5 Kanagawa, (JP)	(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, VN, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
	添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING ISOPRENOID COMPOUNDS BY USING MICROORGANISMS AND METHOD FOR DETECTING COMPOUNDS HAVING ANTIBACTERIAL OR HERBICIDAL ACTIVITY

(54) 発明の名称 微生物によるイソプレノイド化合物の製造方法および抗菌または除草活性化合物の探索方法

(57) Abstract

A process for producing proteins or isoprenoid compounds by using at least one DNA involving a DNA encoding the above proteins which have an activity of elevating the efficiency of synthesizing isoprenoid compounds useful in drugs for the treatment of heart diseases or osteoporosis, hemostasis, prevention of cancer, immunopotentialization, etc., health foods, antifouling coatings, etc.; and a method for detecting compounds having antibacterial activity and herbicidal activity characterized by detecting the above DNAs, the above proteins or substances capable of inhibiting enzymatic reactions on the non-mevalonate pathway.

(57)要約

本発明は、心疾患、骨粗鬆症、止血、がん予防、免疫賦活等を目的とした医薬品、健康食品および貝類付着防止塗料等に有用なイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNAを1つ以上含むDNAを用いた、該DNAのコードする蛋白質あるいはイソプレノイド化合物の製造方法、ならびに該DNA、該蛋白質、非メバロン酸経路上の酵素反応を阻害する物質を探索することを特徴とする、抗菌および除草活性物質の探索方法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LA ラオス	SV スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TR トルコ
CC 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モリタニア	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	NE ニジェール	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NL オランダ	VN ヴェトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NO ノルウェー	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	PL ポーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KR 韓国		

明細書

微生物によるイソプレノイド化合物の製造方法および
抗菌または除草活性化合物の探索方法

技術分野

本発明は、原核生物由来の形質転換体を用いたイソプレノイド化合物の製造方法、ならびに非メバロン酸経路に係わる抗菌または除草活性物質の探索方法に関する。

背景技術

イソプレノイドとは、炭素数5のイソプレン単位を基本骨格に持つ化合物の総称で、イソペンテニルピロリン酸（IPP）の重合によって生合成される。自然界には多種多様なイソプレノイド化合物が存在しており、人類にとって有用なものも多い。

例えば、ユビキノンは電子伝達系の必須成分として、生体内で重要な機能を果たしており、心疾患に効果のある医薬品として使用されているほか、欧米では健康食品としての需要が増大している。

ビタミンKは血液凝固系に関与する重要なビタミンであり、止血剤として利用されているほか、最近骨代謝への関与が示唆され、骨粗鬆症治療への応用が期待されており、フィロキノンとメナキノンは医薬品として許可されている。

また、ユビキノンやビタミンK類には貝類の付着阻害作用があり、貝類付着防止塗料への応用が期待される。

さらに、カロテノイドと呼ばれる炭素数40のイソプレン骨格を基本とする化合物は抗酸化作用があり、 β -カロチン、アスタキサンチン、クリプトキサンチンなど、がん予防や免疫賦活活性を有するものとして期待されているものもある。

このように、イソプレノイド化合物には多くの有用物質が含まれており、これらの安価な製造方法が確立されれば、社会的にも医学的にも多大な恩恵があると

思われる。

発酵法によるイソプレノイド化合物の生産は以前から検討されており、培養条件の検討や変異処理による菌株育種、さらに遺伝子工学的手法による生産量の向上への試みもなされている。しかし、その効果は個々の化合物種に限定されており、イソプレノイド化合物全般に効果のある方法は知られていない。

イソプレノイド化合物の基本骨格単位であるイソペンテニルピロリン酸 (IPP) は、動物や酵母などの真核生物ではアセチルCoAからメバロン酸を経由して生合成される (メバロン酸経路) ことが証明されている。

メバロン酸経路では3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoA (HMG-CoA) リダクターゼが律速と考えられており [Mol. Biol. Cell, 5, 655(1994)]、酵母において、HMG-CoAリダクターゼを高発現化させカロテノイドの生産性を上げる試みがなされている [三沢ら カロテノイド研究談話会講演要旨集(1997)]。

原核生物ではメバロン酸経路の存在を証明した知見はなく、別の経路、即ち、ビルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸が縮合して生じる1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸を経由してIPPが生合成されるという非メバロン酸経路が多く、多くの原核生物において発見されており [Biochem. J., 295, 517 (1993)]、¹³Cラベル化基質を使った実験から1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸は2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を経由してIPPへと転換されることが示唆されている [Tetrahedron Lett. 38, 4769(1997)]。

大腸菌において、ビルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸を縮合させ1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸を生合成させる酵素1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸合成酵素 (DXS) をコードする遺伝子が同定されている [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 12857 (1997)]。該遺伝子は、ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするispAを含む4つのORFからなるオペロンに含まれている。

更に、大腸菌においては、1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸を2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸に変換する活性が存在することが知られている [Tetrahedron Lett. 39, 4509(1998)]。

該オペロンに含まれるこれら遺伝子を操作して、イソプレノイド化合物の生産性を向上させることに関する記載も示唆も現時点ではない。

原核生物における非メバロン酸経路に関する知見は徐々に蓄積されつつあるが、関与する酵素やそれをコードする遺伝子の多くは未だ不明である。

光合成細菌において、コリスメートを4-ヒドロキシベンゾエートへ転換する酵素ubiCの遺伝子(ubiC遺伝子)およびp-ヒドロキシベンゾエートトランスフェラーゼの遺伝子(ubiA)を導入することにより、ユビキノン-10を効率的に生産する方法が知られている(特開平8-107789)が、非メバロン酸経路の酵素遺伝子を操作することによってイソプレノイド化合物の生産性を向上させた例は皆無である。

更に、非メバロン酸経路上の反応を、変異または薬剤処理等により阻害することにより、原核生物がいかなる影響を受けるかに関する知見はない。

発明の開示

本発明の課題は、心疾患、骨粗鬆症、止血、がん予防、免疫賦活等を目的とした医薬品、健康食品および貝類付着防止塗料等に有用なイソプレノイド化合物の生合成に関与するDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の製造方法、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、該蛋白質の製造方法、該蛋白質および該蛋白質をコードするDNAを提供することにある。さらに、本発明の課題は、非メバロン酸経路上の酵素反応を阻害する物質を探索することを特徴とする、抗菌および除草活性物質の探索方法を提供することにある。

本発明者らは、原核生物によるイソプレノイド生産性を向上させることのできるDNAを検索し、得られたDNAを原核生物に導入することにより、イソプレノイド生産性を向上させることのできることを見出し本発明を完成するに至った。

即ち、本願の第1の発明は、以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および(f)から選ばれるDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の製造方法である。

(a) はビルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNA、

(b) はファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするDNA、

(c) は配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNA、

(d) は配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNA、

(e) は1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNA、

(f) は(a)、(b)、(c)、(d)および(e)から選ばれるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ選ばれたDNAにコードされた蛋白質が有する活性と実質的に同一の活性を有している蛋白質をコードするDNAである。

本明細書中の、アミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である

部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数、例えば1～5個のアミノ酸を意味する。

かかる1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質は、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning, A laboratory manual)、第二版〔サンプブルック(Sambrook)、フリッチ(Fritsch)、マニアチス(Maniatis)編集、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年刊(以下、モレキュラー・クローニング 第二版と略す)〕、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

上記において、ビルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質をコードするDNAとして、例えば、配列番号1、26または28に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、あるいはこれら蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつビルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNA等をあげることができる。

具体的な例として、配列番号6に記載の塩基配列を有するDNA、配列番号27または29に記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするDNAとして、例えば、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつファルネシルピロリン酸合成酵素活性を有

する蛋白質をコードするDNAをあげることができる。具体的な例として、配列番号7記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAの具体的な例として、配列番号8記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAの具体的な例として、配列番号9記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNAとして、例えば、配列番号5または30に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNA等をあげることができる。

該DNAの具体的な例として、配列番号10または31に記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

上記の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、上記のDNAまたは該DNAの断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラックハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブラック由来のDNAまたは該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍程度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング 第二版等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして、

具体的には配列番号 1、2、3、4 および 5 から選ばれる塩基配列と少なくとも 70 % 以上の相同性を有する DNA、好ましくは 90 % 以上の相同性を有する DNA をあげることができる。

イソプレノイド化合物として、例えば、ユビキノン、ビタミン K₂、カロテノイド等をあげることができる。

本願の第 2 の発明は、以下の (a)、(b) および (c) から選ばれるイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質である。

(a) は配列番号 3 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質、

(b) は配列番号 4 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質、

(c) は配列番号 5 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質である。

本願の第 3 の発明は、上記の第 2 の発明に記載の蛋白質をコードする DNA をベクターに組み込み、得られた組換え体 DNA を宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することの特徴とする、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質の製造方法である。

上記において、形質転換体として、Escherichia 属に属する微生物、Rhodobacter 属に属する微生物または Erwinia 属に属する微生物をあげることができる。

本願の第 4 の発明は、以下の (a)、(b)、(c) および (d) から選ばれるイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードする DNA である。

(a) は配列番号 3 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA、

- (b) は配列番号 4 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA、
- (c) は配列番号 5 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA、
- (d) は配列番号 8 記載の塩基配列を有する DNA、
- (e) は配列番号 9 記載の塩基配列を有する DNA、
- (f) は配列番号 10 記載の塩基配列を有する DNA、
- (g) は (a) ~ (f) いずれかに記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA である。

本願の第 5 の発明は、ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3 リン酸より 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生合成した後、2-C-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸の生合成を経由しイソペンテニルピロリン酸を生合成するための非メバロン酸経路上に存在する酵素から選ばれる酵素の有する活性を有している蛋白質の反応を阻害する物質を探索することを特徴とする抗菌活性を有する物質の探索方法である。

本願の第 6 の発明は、ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3 リン酸より 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生合成した後、2-C-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸の生合成を経由しイソペンテニルピロリン酸を生合成するための非メバロン酸経路上に存在する酵素から選ばれる酵素の有する活性を有している蛋白質の反応を阻害する物質を探索することを特徴とする除草活性を有する物質の探索方法である。

上記発明 5 および 6 において、蛋白質として、以下の (a) または (b) の蛋白質をあげることができる。

(a) はピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質、

(b) は 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸から 2-C-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質である。

上記において、ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質として、例えば、配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ

酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をあげることができる。

1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質として、例えば、配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をあげることができる。

本発明の第7の発明は、上記第5の発明の探索方法により取得される抗菌活性を有する物質である。ただし、該探索方法により取得される公知の物質は本発明に入らない。

本発明者らは、1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼ反応の産物である2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸やこの酵素反応で想定される反応中間体とフォスミドマイシン [3-(N-formyl-N-hydroxyamino)propylphosphonic acid] との構造的類似性に着目し、フォスミドマイシンが1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼ阻害活性を有し、かつ抗菌活性をも有するとの推測の基に、後述の実施例10に示した上記第5の発明の探索方法の実験を行い、フォスミドマイシンが、該阻害活性を有し、かつ抗菌活性を有する物質であることを見いだすと共に、上記第5の発明の探索方法の妥当性を証明したが、公知であるフォスミドマイシンは本発明から除かれる。

本発明の第8の発明は、上記第6の発明の探索方法により取得される除草活性を有する物質である。上記同様、該探索方法により取得される公知の物質は本発明に入らない。

以下、本発明を詳細に説明する。

I. イソプレノイド化合物の生合成に関与する蛋白質をコードするDNAの取得

(1) DXSをコードするDNA (DXS遺伝子) の塩基配列を利用した、イソプレノイド化合物の生合成に関与する蛋白質をコードするDNAの取得

既に決定されている、大腸菌の染色体およびDXS遺伝子の塩基配列情報 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 12857 (1997)] を利用し、大腸菌よりDXS遺伝子を含む、あるいはDXS遺伝子近隣の遺伝子のDNA領域をPCR法 [Science, 230, 1350(1985)] によりクローニングし、取得することができる。

DXS遺伝子を含む塩基配列情報として、例えば、配列番号11に記載の塩基配列をあげることができる。

DXS遺伝子を含むDNA領域の取得法としては、具体的には以下の方法をあげることができる。

大腸菌、例えばE. coli XLI-Blue株 (東洋紡より購入可能) を大腸菌に適した培地、例えばLB液体培地 (バクトトリプトン(ディフコ社製) 10g、酵母エキス(ディフコ社製) 5g、NaCl 5gを水1リットルに含みpH7.2に調整した培地) を用い常法に従って培養する。

培養後、培養物より遠心分離により菌体を取得する。

取得した菌体より公知の方法 (例えば、モレキュラー・クローニング 第二版) に従い染色体DNAを単離する。

配列番号11に記載された塩基配列情報を利用し、DXS遺伝子を含む、あるいはDXS遺伝子近隣の遺伝子のDNA領域に対応する塩基配列を含有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成する。

PCR法により増幅後、該増幅DNA断片をプラスミドに導入可能なようにセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーの5'末端には適切制限酵素サイト、例えばBamHI、EcoRI等の制限酵素サイトを付加させることが好ましい。

該センスプライマー、アンチセンスプライマーの組合せとしては、例えば、配

列番号 1 2 および 1 3、配列番号 1 4 および 1 5、配列番号 1 2 および 1 6、配列番号 1 7 および 1 8、配列番号 1 9 および 1 3、配列番号 2 2 および 2 3 の組合せの塩基配列を有する DNA 等をあげることができる。

染色体 DNA を鋳型として、これらプライマー、TaKaRa LA-PCR™ Kit Ver. 2 (宝酒造社製) または Expand™ High-Fidelity PCR System (ベーリンガー・マンハイム社製) 等を用い、DNA Thermal Cycler (パーキンエルマー・ジャパン社製) で PCR を行う。

PCR の条件として、上記プライマーが 2 kb 以下の DNA 断片の場合には 94℃ で 30 秒間、55℃ で 30 秒～1 分間、72℃ で 2 分間からなる反応工程を 1 サイクルとして、2 kb を超える DNA 断片の場合には 98℃ で 20 秒間、68℃ で 3 分間からなる反応工程を 1 サイクルとして、30 サイクル行った後、72℃ で 7 分間反応させる条件をあげることができる。

該増幅された DNA 断片を、大腸菌で増幅可能な適切なベクターを上記プライマーで付与した制限酵素サイトと同じサイトで切断後、アガロース電気泳動、シユークロース密度勾配超遠心分離等の手法により DNA 断片を分画・回収する。

該回収 DNA 断片を用い、常法、例えば、モレキュラー・クローニング 第二版、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) 等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えば SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (ライフ・テクノロジーズ社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit [ストラタジーン (Stratagene) 社製] を用いクローニングベクターを作製し、作製した該クローニングベクターを用い、大腸菌、例えば *E. coli* DH5α 株 (東洋紡より購入可能) を形質転換する。

該大腸菌を形質転換するためのクローニングベクターとしては、大腸菌 K12 株中で自律複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる、大腸菌の発現用ベクターをクローニングベクターとして用いてもよい。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5,

58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (ストラタジーン社製)、 λ gt10、 λ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、 λ TriplEx (クローンテック社製)、 λ ExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [H. Okayama and P. Berg; Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pMW218 (和光純薬社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pEG400 [J. Bac., 172, 2392 (1990)]、pQE-30 (QIAGEN社製)等をあげることができる。

得られた形質転換株より、目的とするDNAを含有したプラスミドを常法、例えば、モレキュラー・クローニング 第二版、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法により取得することができる。

該方法により、ビルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNA、ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするDNA、配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA等を有するプラスミドおよびこれらDNAを1つ以上含むプラスミドを取得することができる。

該プラスミドとして、例えば、上記DNAを全て含むプラスミドpADO-1、配列番号6記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドpDXS-1あるいはpQEDXS-1、配列番号7記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドpISP-1、配列番号8記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドpXSE-1、配列番号9記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドpTFE-1等をあげることができる。

これらプラスミドに挿入された大腸菌由来のDNA断片の塩基配列を利用し、他の原核生物、例えば、Rhodobacter属に属する微生物等より、該DNAのホモログを上記と同様の方法により取得することができる。

(2) 大腸菌のメチルエリスリトール要求性変異株を相補することのできる活

性を有する蛋白質をコードするDNA（メチルエリスリトール要求性相補遺伝子）の取得

① 大腸菌メチルエリスリトール要求性変異株の取得

大腸菌、例えば *E. coli* W3110株（ATCC14948）を、常法に従って培養する。

培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得する。

該菌体を、適切な緩衝剤、例えば、0.05 M トリスマレイン酸緩衝液（pH 6.0）等で洗浄後、菌体濃度が $10^4 \sim 10^{10}$ 細胞/ml になるように同緩衝液に懸濁する。

該懸濁液を用いて常法により変異処理を行う。常法として、例えば、該懸濁液にNTGを終濃度が600 mg/l になるように加え、室温で20分間保持して変異処理する方法をあげることができる。

該変異処理懸濁液を最少寒天培地に0.05～0.5%メチルエリスリトールを添加した培地で培養する。

最少寒天培地として、例えば、M9培地（モレキュラー・クローニング 第二版）に寒天を添加した培地等をあげることができる。

メチルエリスリトールは、Tetrahedron Letters, 38, 35, 6184 (1997)に記載の方法に準じて化学合成したものを用いることができる。

培養後、生育し形成されたコロニーを、最少寒天培地とメチルエリスリトールを0.05～0.5%含む最少寒天培地にレプリカし、メチルエリスリトール要求性を示すもの、すなわち、メチルエリスリトールを含む最少寒天培地では生育できるが、最少寒天培地では生育できない株を目的の変異株として選択する。

該操作により取得されたメチルエリスリトール要求性変異株としてME7株をあげることができる。

② メチルエリスリトール要求性相補遺伝子の取得

大腸菌、例えば、*E. coli* W3110株（ATCC14948）を培養培地、例えば、LB液体培地に植菌し、常法に従って対数増殖期まで培養する。

培養後、得られた培養液を遠心分離して菌体を回収する。

得られた菌体より、常法（例えば、モレキュラー・クローニング 第二版に記

載の方法)に従い染色体DNAを単離・精製する。上記(1)に記載の方法で取得される染色体DNAを単離・精製された染色体DNAとして用いることもできる。

該染色体DNAの適当量を適切な制限酵素、例えば、S a u 3 A I で部分消化し、得られた消化DNA断片を、常法、例えば、シュークローズ密度勾配超遠心分離(26,000rpm、20℃、20hr)により、サイズ分画する。

該分画により取得される大きさが4~6kbのDNA断片を、適切な制限酵素で消化したベクター、例えば、pMW118(ニッポンジーン社製)にライゲーションすることにより染色体ゲノムライブラリーを作製する。

作製した染色体ライブラリーを用い、上記①で分離されたメチルエリスリトール要求性変異株、例えば、ME7株を常法(例えば、モレキュラー・クローニング 第二版に記載の方法)に従い形質転換する。

該形質転換体を、ベクターの有する薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤を添加した最少寒天培地、例えば、アンピシリン100 μ g/l入れたM9寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養する。

該方法により、メチルエリスリトール要求性の回復された形質転換体を選択することができる。

得られた該形質転換体より、常法によりプラスミドを抽出する。該メチルエリスリトール要求性を回復させることのできるプラスミドとして、例えばpMEW73、pQEDXRをあげることができる。

該プラスミド中に導入されたDNAの塩基配列を決定する。

該方法により決定された塩基配列として、配列番号10に示されるyaeM遺伝子の塩基配列を含む配列等をあげることができる。得られた該yaeM遺伝子の塩基配列情報を利用して他の原核生物あるいは植物から該yaeM遺伝子のホモログを上記と同様の方法により取得することができる。

II. イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質の製造

上記のようにして得られたDNAを宿主細胞中で発現させるためには、まず、目的とする該DNA断片を、制限酵素類あるいはDNA分解酵素類で、該遺伝子を含む適当な長さのDNA断片とした後に、発現ベクター中プロモーターの下流に挿入し、次いで上記DNAを挿入した発現ベクターを、発現ベクターに適合した宿主細胞中に導入する。

宿主細胞としては、目的とする遺伝子を発現できるものは全て用いることができる。例えば、エッシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属、ミクロバクテリウム属等に属する細菌、クルイベロミセス属、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、トリコスボロン属、シワニオミセス属等に属する酵母や動物細胞、昆虫細胞等をあげることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込みが可能で、上記目的とするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等を宿主細胞として用いる場合は、上記DNAを発現させるための発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、上記DNAおよび転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pKK233-2 (Pharmacia社製)、pSE280 (Invitrogen社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pQE-30 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK+、pBluescriptII SK(-) (Stratagene社製)、pTrs30(FERMBP-5407)、pTrs32(FERM BP-5408)、pGEX (Pharmacia社製)、pET-3 (Novagen社製)、pTerm2(US4686191、US 4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pUC18 [gene, 33, 103 (1985)]、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28(宝酒造社製)、pSTV29 (宝

酒造社製)、pUC118(宝酒造社製)、pPA1(特開昭63-233798)、pEG400[J. Bacteriol., 172, 2392(1990)]、pQE-30(QIAGEN社製)等を例示することができる。

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター(P_{trp})、lacプロモーター(P_{lac})、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、P_{SE}プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP_{trp}を2つ直列させたプロモーター(P_{trp} x 2)、tacプロモーター、letIプロモーター、lacT7プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよいが、シャインーダルガノ(Shine-Dalgarno)配列と開始コドンとの間を適当な距離(例えば6~18塩基)に調節したプラスミッドを用いることが好ましい。

目的とするDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主細胞としては、Escherichia属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Microbacterium属、Serratia属、Pseudomonas属、Agrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、Arthrobacter属、Azobacter属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Scenedesmun属、Streptomyces属、Synecoccus属、Zymomonas属等に属する微生物をあげることができ、好ましくは、Escherichia属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Pseudomonas属、Agrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、Arthrobacter属、Azobacter属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Scenedesmun属、Streptomyces属、Synecoccus属、Zymomonas属に属する微生物等をあげることができる。

該微生物の具体例として、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli DH5 α 、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli MP347、Escherichia coli NM522、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14297、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Pseudomonas sp. D-0110、Agrobacterium radiobacter、Agrobacterium rhizogenes、Agrobacterium rubi、Anabaena cylindrica、Anabaena doliolum、Anabaena flos-aquae、Arthrobacter aurescens、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globiformis、Arthrobacter hydrocarboglutamicus、Arthrobacter mysorens、Arthrobacter nictitanae、Arthrobacter paraffineus、Arthrobacter protophormiae、Arthrobacter roseoparaffinus、Arthrobacter sulfureus、Arthrobacter ureafaciens、Chromatium buderi、Chromatium tepidum、Chromatium vinosum、Chromatium warmiingii、Chromatium fluviatile、Erwinia uredovora、Erwinia carotovora、Erwinia ananas、Erwinia herbicola、Erwinia punctata、Erwinia terreus、Methylobacterium rhodesianum、Methylobacterium extorquens、Phormidium sp. ATCC29409、Rhodobacter capsulatus、Rhodobactersphaeroides、Rhodopseudomonas blastica、Rhodopseudomonas marina、Rhodopseudomonas palustris、Rhodospirillum rubrum、Rhodospirillum salexigens、Rhodospirillum salinarum、Streptomyces ambofaciens、Streptomyces aureofaciens、Streptomyces aureus、Streptomyces fungicidicus、Streptomyces griseochromogenes、Streptomyces griseus、Streptomyces lividans、Streptomyces olivogriseus、Streptomyces r

ameus, Streptomyces tanashiensis, Streptomyces vinaceus, Zymomonas mobilis等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-2483942)、またはGene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp 13 (ATCC37115)、YEp 24 (ATCC37051)、YCP 50 (ATCC37419)、pHS 19、pHS 15等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO 5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、クリュイベロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)、トリコスボロン・プルランス (Trichosporon pullulans)、シュワニオミセス・アルビウス (Schwanniomyces alluvius)等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163(1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE 107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS 3-3 (特開平2-227075)、p

CDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、p cDNA I/Amp (Invitrogen社製)、p REP4 (Invitrogen社製)、p AGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、p AGE210等を例示することができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒトCMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ナマルバ細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、COS1細胞、COS7細胞、CHO細胞等をあげることができる。

動物細胞への組換えベクターの導入法としては、動物細胞にDNAを導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133(1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 84, 7413(1987)]、virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等を用いることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ・ア・ラボラトリー・マニュアル (Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サブルメント1-38 (1987-1997)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製)

等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞である Sf 9、Sf 21〔バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)〕、Trichoplusia niの卵巣細胞である High 5 (インビトロジェン社製)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第二版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

上記DNAを組み込んだ組換え体DNAを保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質を製造することができる。

本発明のイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質製造用の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、

これら微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般

に使用されているRPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常pH 6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 [Pharmingen社製]、Sf-900 II SFM培地 (ギブコBRL社製)、ExCell400、ExCell405 [いずれもJRH Biosciences社製]、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

本発明の形質転換体の培養物から、本発明のイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質を単離精製するには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロ

マトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを
用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティー
クロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳
動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回
収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法によ
り該蛋白質を回収後、該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化
液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しな
い程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該蛋白質を正常な立体構造に構成
させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

本発明の蛋白質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合に
は、培養上清に該蛋白質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することがで
きる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することによ
り可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いるこ
とにより、精製標品を得ることができる。

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号 1～5 に示される
アミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質をあげることができる。

また、上記方法により発現させた蛋白質を、Fmoc法(フルオレニルメチル
オキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成
法によっても製造することができる。また、桑和貿易(米国Advanced chemTech社
製)、パーキンエルマージャパン(米国Perkin-Elmer社製)、ファルマシアバイオ
テク(スウェーデンPharmacia Biotech社製)、アロカ(米国Protein Technology I
nstrument社製)、クラボウ(米国Synthecell-Vega社製)、日本パーセプティブ・
リミテッド(米国PerSeptive社製)、島津製作所等のペプチド合成機を利用し合成
することもできる。

III. イソプレノイド化合物の製造

上記II. で取得された形質転換体を、上記II. の方法に準じて培養し、培養物

中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することによりイソプレノイド化合物を製造することができる。

該培養により、ユビキノン、ビタミンK₂、カロテノイド等のイソプレノイド化合物を製造することができる。具体的な例として、例えば、Escherichia属に属する微生物を形質転換体としたユビキノン-8やメナキノン-8の製造、Rhodobacter属に属する微生物を形質転換体としたユビキノン-10の製造、Arthrobacter属に属する微生物を形質転換体としたビタミンK₂の製造、Agrobacterium属に属する微生物を形質転換体としたアスタキサンチンの製造、Erwinia属に属する微生物を形質転換体としたリコペン、 β -カロテン、ゼアキサンチンの製造等をあげることができる。

培養終了後、培養液に適当な溶媒を加えてイソプレノイド化合物を抽出し、遠心分離などで沈殿物を除去した後、各種クロマトグラフィーを行うことによりイソプレノイド化合物を単離・精製することができる。

IV. 非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質の探索

(1) 非メバロン酸経路上の酵素活性の測定

非メバロン酸経路上の酵素活性の測定は、通常の酵素の活性測定法に準じて行うことができる。

即ち、活性測定の反応液に用いる緩衝液のPHは、目的とする酵素の活性を阻害しないPH範囲であればよく、最適PHを含む範囲のPHが好ましい。

例えば、1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼにおいては、pH5~10、好ましくは6~9である。

緩衝液としては、酵素活性を阻害せず、上記pHを達成できるものであればいずれの緩衝液も用いることができる。該緩衝液として、トリス塩酸緩衝液やリン酸緩衝液、硼酸緩衝液、HEPES緩衝液、MOPS緩衝液、炭酸水素緩衝液などを用いることができる。1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼにおいては、例えば、トリス塩酸緩衝液が好適に用いられる。

緩衝液の濃度は酵素活性に阻害を及ぼさない限りどのような濃度でも用いるこ

とができるが、好適には1 mMから1 Mである。

目的とする酵素に補酵素が必要な場合には、反応液に補酵素を添加する。例えば、1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼにおいては、NADPH、NADHあるいはその他の電子供与体を用いることができ、好ましくはNADPHをあげることができる。

添加する補酵素の濃度は、反応を阻害しない限りいずれの濃度でも用いることができるが、好適には0.01 mM~100 mM、より好ましくは0.1 mM~10 mMの濃度である。

反応液には必要に応じて金属イオンを添加してもよい。金属イオンは、反応を阻害しない限りどのようなものでも添加することができるが、好適には Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} などがあげられる。

金属塩として金属イオンを添加することができ、例えば、塩化物や硫酸塩、炭酸塩、リン酸塩などとして添加することができる。

添加する金属イオンの濃度は、反応を阻害しない限りどのような濃度でも添加できるが、好適には0 mMから100 mM、より好適には0.1 mMから10 mMである。

反応液には、目的とする酵素の基質を添加する。例えば、1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼにおいては、1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸を添加する。

基質の濃度は反応に支障のない限りどのような濃度でも用いることができるが、好適には反応液中の濃度は0.01 mM~0.2 Mである。

反応に用いる酵素濃度に特に制限はないが、通常0.01 mg/mlから100 mg/mlの濃度範囲で反応を行う。

用いる酵素は必ずしも単一にまで精製されている必要はなく、反応を妨害しない限り、他の狭雑蛋白質が混入した標品であってもよい。また、下記(2)の探索においては、該酵素活性を含む細胞抽出液あるいは該酵素活性を有する細胞も用いることができる。

反応温度は、目的とする酵素の活性を阻害しない温度範囲であればよく、最適

温度を含む範囲の温度が好ましい。即ち、反応温度は、10℃から60℃、より好ましくは30℃から40℃である。

活性の検出は、反応に伴う基質の減少、あるいは反応生成物の増加を、基質あるいは反応生成物を測定できる方法を用いて行うことができる。

該方法として、例えば、必要に応じて高速液体クロマトグラフィー法（HPLC）等により目的物質を分離定量する方法をあげることができる。また反応の進行に伴ってNADHやNADPHが増減する場合には、反応液の340nmの吸光度を測定することで活性を直接測定することができる。例えば、1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼにおいては、340nmの吸光の減少を分光光度計で測定することにより反応の進行に伴い減少するNADPHを定量し、活性を検出することができる。

（2）非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質の探索

非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質の探索は、上記（1）の酵素活性測定系に被探索物質を加えて同様に反応させ、無添加時より基質の減少量を抑えるような物質あるいは反応産物の生成量を抑えるような物質を探索することで行うことができる。

探索の方法としては、基質の減少量あるいは反応生産物の増加量等を経時的に追跡する方法、一定時間反応させた後の基質の減少量あるいは反応生産物の増加量等を測定する方法等をあげることができる。

基質の減少量あるいは反応生産物の増加量等を経時的に追跡する方法においては、反応中15秒～20分程度の間隔で基質の減少量あるいは反応生産物の増加量を測定することが好ましく、1～3分間隔で測定することがより好ましい。

一定時間反応させた後の基質の減少量あるいは反応生産物の増加量等を測定する方法においては、反応時間は、10分～1日が好ましく、より好ましくは30分～2時間である。

非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質は、該非メバロン酸経路を有する微生物および植物の生育を阻害する。該物質が該微生物および植物の生育を阻害することは、本発明者らが始めて見出した。

非メバロン酸経路は微生物や植物に存在し、動物や人には存在しないことより、上記探索方法により、人や動物に影響を及ぼさない、非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質を取得することができる。

該物質は、有効な抗菌剤あるいは除草剤となり得る。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願平成10年第103101号、同第221910号および平成11年第035739号の明細書に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼの活性に対する反応温度の影響を示した図である。

図2は、1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼの活性に対する反応液pHの影響を示した図である。100mMトリス塩酸緩衝液中の各pHにおける活性を示した。pH8.0での活性を100%として、各pHにおける活性を相対活性として示した。

図3は、相同組換えを利用した染色体上のyaeM遺伝子破壊方法を示した図である。

図4は、1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼ活性に及ぼすフォスミドマイシンの影響を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。実施例で示した遺伝子組換え実験は、特に言及しない限りモレキュラー・クローニング 第二版に記載の方法（以下、常法と呼ぶ）を用いて行った。

（実施例1） イソプレノイド化合物の生合成に関与する蛋白質をコードするDNAの取得

（1） 大腸菌DXS遺伝子の塩基配列を利用した、イソプレノイド化合物の生

合成に関与する蛋白質をコードするDNAの取得

E. coli XL1-Blue株（東洋紡より購入）を1白金耳、10mlのLB液体培地に植菌し、37℃で一晩培養した。

培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得した。

該菌体より、常法に従い染色体DNAを単離・精製した。

配列番号12および13、配列番号14および15、配列番号12および16、配列番号17および18、配列番号19および13の塩基配列の組合せを有する5'末端にBamHIおよびEcoRI制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマー、配列番号22および23の塩基配列の組合せを有する5'末端にBamHI制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成した。

染色体DNAを鋳型として、これらプライマーと、TaKaRa LA-PCR™ Kit Ver. 2(宝酒造社製)、Expand™ High-Fidelity PCR System(ベーリンガー・マンハイム社製)またはTaq DNA polymerase (Boehringer社製)を用い、DNA Thermal Cycler(パーキンエルマージャパン社製)でPCRを行った。

PCRは、2kb以下のDNA断片は94℃で30秒間、55℃で30秒～1分間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルとして、2kbを超えるDNA断片は98℃で20秒間、68℃で3分間からなる反応工程を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件で行った。

PCRにより増幅されたDNA断片のうち、5'末端にBamHIおよびEcoRI制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを用いて増幅されたDNA断片は制限酵素BamHIおよびEcoRIで消化し、5'末端にBamHI制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを用いて増幅されたDNA断片は制限酵素BamHIで消化した。

消化後、これら制限酵素処理DNA断片をアガロースゲル電気泳動し、BamHI-EcoRI処理DNA断片およびBamHI処理DNA断片を取得した。

lacプロモーターを有する広宿主域ベクターpEG400 (J. Bac., 172,

2392 (1990)] を、制限酵素 B a m H I および E c o R I で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、B a m H I - E c o R I 処理 p E G 4 0 0 断片を取得した。

p U C 1 1 8 (宝酒造社製) を制限酵素 B a m H I で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い B a m H I 処理 p U C 1 1 8 断片を取得した。

上記で取得された B a m H I - E c o R I 処理 DNA 断片各々について B a m H I - E c o R I 処理 p E G 4 0 0 断片と混合した後、エタノール沈殿を行い、得られた DNA 沈殿物を 5 μ l の蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体 DNA を各々取得した。

該組換え体 DNA を用い、E. coli (東洋紡より購入) DH5 α 株を常法に従って形質転換後、該形質転換体をスペクチノマイシン 1 0 0 μ g / m l を含む L B 寒天培地に塗布し、3 7 $^{\circ}$ C で一晩培養した。

生育してきたスペクチノマイシン耐性の形質転換体のコロニー数個について、スペクチノマイシン 1 0 0 μ g / m l を含む L B 液体培地 1 0 m l で 3 7 $^{\circ}$ C 1 6 時間振盪培養した。

得られた培養液を遠心分離することにより菌体を取得した。

該菌体より常法に従ってプラスミドを単離した。

該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、塩基配列を決定することにより、目的の DNA 断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。

配列番号 6 記載の塩基配列を有する DNA、配列番号 7 記載の塩基配列を有する DNA、配列番号 8 記載の塩基配列を有する DNA および配列番号 9 記載の塩基配列を有する DNA を含むプラスミドを p A D O - 1、配列番号 6 記載の塩基配列を有する DNA を含むプラスミドを p D X S - 1、配列番号 7 記載の塩基配列を有する DNA を含むプラスミドを p I S P - 1、配列番号 8 記載の塩基配列を有する DNA を含むプラスミドを p X S E - 1、配列番号 9 記載の塩基配列を有する DNA を含むプラスミドを p T F E - 1 と命名した。

また、上記で取得された B a m H I 処理 DNA 断片および B a m H I 処理 p U C 1 1 8 断片を混合した後、エタノール沈殿を行い、得られた DNA 沈殿物を 5

μ l の蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。以後上記と同様の方法で、大腸菌を形質転換し、該大腸菌よりプラスミドを単離した。

上記同様、該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、塩基配列を決定することにより、目的のDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。

該プラスミドを B a m H I 処理し、目的のDNA断片を上記と同様の方法で回収し、発現ベクター p Q E 3 0 (Qiagen社製) に常法によりサブクローニングした。

該サブクローニングにより得られた、配列番号 6 記載の塩基配列を有するプラスミドを p Q E D X S - 1 と命名した。

(2) メチルエリスリトール要求性相補遺伝子の取得

① 大腸菌メチルエリスリトール要求性変異株の取得

E. coli W3110株 (ATCC14948) を、LB液体培地に植菌し、対数増殖期まで培養した。

培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得した。

該菌体を、0.05 M トリス・マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) で洗浄後、菌体濃度が 10^9 細胞 / ml になるように同緩衝液に懸濁した。

該懸濁液に NTG を終濃度が 600 mg / l になるように加え、室温で 20 分間保持して変異処理を行った。

得られた変異処理菌体をメチルエリスリトール 0.1 % を含む M9 最少寒天培地 [モレキュラー・クローニング 第二版] プレートに塗布し、培養した。

メチルエリスリトールは、Tetrahedron Letters, 38, 35, 6184 (1997) に記載の方法に準じて化学合成した。

メチルエリスリトール 0.1 % を含む M9 最少寒天培地上で生育してきたコロニーを、M9 最少寒天培地とメチルエリスリトールを 0.1 % 含む M9 最少寒天培地にレプリカし、メチルエリスリトール要求性を示すもの、すなわち、メチルエリスリトールを 0.1 % 含む M9 最少寒天培地では生育できるが、M9 最少寒天培地では生育できない株を目的の変異株として選択した。

該選択により得られたメチルエリスリトール要求性変異株ME 7株を以下の実験に用いた。

② メチルエリスリトール要求性相補遺伝子の取得

E. coli W3110株 (ATCC14948) をLB液体培地に植菌して対数増殖期まで培養した後、遠心分離して菌体を回収した。

得られた菌体より、常法に従い染色体DNAを単離・精製した。

該染色体DNA 200 μ gを制限酵素 Sau 3 A Iで部分消化し、得られた消化DNA断片を、シークロス密度勾配超遠心分離 (26,000 rpm、20℃、20 hr) により、サイズ分画した。

該分画により取得された大きさが4~6 kbのDNA断片を、制限酵素 Bam H Iで消化したベクターpMW118 (ニッポンジーン社製) にライゲーションすることにより染色体ゲノムライブラリーを作製した。

作製した染色体ライブラリーを用い、上記①で分離されたME 7株を常法に従い形質転換した。

得られた形質転換体を、アンピシリン100 μ g/l入れたLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

該培養において生育してきた複数のコロニーからプラスミドを抽出して塩基配列を決定した。

塩基配列を決定したクローンは配列番号10に示される塩基配列を含む配列を有していた。これらのプラスミドをpMEW41およびpMEW73と名づけた。

該配列を有するクローンの1株より抽出したプラスミドをpMEW73と命名した。

pMEW73を Hind IIIおよび Sac Iで二重消化し、得られた配列番号10に示される塩基配列を有する Hind III-Sac I処理DNA断片を広宿主域ベクターpEG400 [J. Bac., 172, 2392 (1990)] のマルチクローニングサイトに連結してpEGYM1を作製した。

上記 Hind III-Sac I処理DNA断片をベクターpUC19 [Gene, 33, 103 (1985)] の Hind III-Sac I部位に連結してpUCYM-1を作製した。

Genbankのデータベースに基づく大腸菌の染色体塩基配列情報より、ベクター

に挿入されたDNA断片はy a e M遺伝子を含有することが分かった。

y a e M遺伝子を十分発現させるような組換え体ベクターをPCR法 [Science, 230, 1350 (1985)] を用いて下記方法により構築した。

配列番号20に示した配列を有するセンスプライマーおよび配列番号21に示した配列を有するアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成した。

該センスプライマーおよびアンチセンスプライマーの5'末端にはそれぞれB a m H I の制限酵素サイトを付加させた。

染色体DNAを鋳型として、これらプライマーおよびTaq DNA polymerase (Boehringer社製) を用い、DNA Thermal Cycler (パーキンエルマージャパン社製) でPCRを行うことによりyaeM遺伝子を増幅した。

PCRは、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルと30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件で行った。

増幅されたDNA断片およびpUC118 (宝酒造社製) を制限酵素B a m H I で消化後、各々のDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって精製した。

これら精製された両断片を混合した後エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5 μ l の蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。

該組換え体DNAがy a e M遺伝子であることをDNA配列を決定することによって確認した後、発現ベクターp Q E 3 0 (Qiagen社製) にサブクローニングした。

得られた組換え体DNAをp Q E Y M 1 と命名した。

p Q E Y M 1 を用いて、ME 7 株を常法に従って形質転換後、該形質転換体をアンピシリン100 μ g / m l を含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

該形質転換株は、野生型株と同程度の生育速度でコロニーを形成することが確認されたことより、y a e M遺伝子によりME 7 株の変異が相補されることが分かった。

(実施例 2) 組換え大腸菌によるユビキノン-8 (CoQ8) の生産

(1) 実施例 1 で取得したプラスミド pADO-1、pDXS-1、pXSE-1 またはコントロールとして pEG400 を *E. coli* DH5 α 株にそれぞれ導入し、100 μ g/ml 濃度のスペクチノマイシンに抵抗性を示す形質転換体 *E. coli* DH5 α /pADO-1、*E. coli* DH5 α /pDXS-1、*E. coli* DH5 α /pXSE-1 および *E. coli* DH5 α /pEG400 を各々取得した。

チアミン (thiamine) とビタミンB₆ をそれぞれ 100 mg/l、p-ヒドロキシ安息香酸 50 mg/l、スペクチノマイシン 100 μ g/ml 添加した LB 培地を 10 ml 入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

培養終了後、各々の培養液を 10 倍濃縮した。

各々の濃縮液 300 μ l に 2-ブタノール 300 μ l およびガラスビーズ 300 μ l を加え、マルチビーズショッカー MB-200 (安井器械社製) で 5 分間菌体破碎しつつ、イソプレノイド化合物の溶媒抽出を行った後、遠心分離により 2-ブタノール層を採取した。

該ブタノール層中の CoQ8 を、高速液体クロマトグラフィー (LC-10A 島津製作所製) で定量分析することにより、形質転換体による CoQ8 の生産量を算定した。

カラムは Develosil ODS-HG-5 (野村化学) を用い、メタノール : n-ヘキサン = 8 : 2 の溶液を移動相とし、流速 1 ml/min、測定波長 275 nm の条件で分析した。

結果を第 1 表に示す。

(本頁以下余白)

表 1

大腸菌形質転換株のC o Q 8 生産

形質転換株	生育量 [OD660]	CoQ8生産量 [mg/L]	菌体内含量 ^{*1}
<i>E. coli</i> DH5 α /pEG400	5.8	0.63	1.1
<i>E. coli</i> DH5 α /pAD0-1	5.5	0.98	1.8
<i>E. coli</i> DH5 α /pDXS-1	5.2	0.85	1.6
<i>E. coli</i> DH5 α /pXSE-1	5.6	0.67	1.2

* 1 : 菌体内含量はC o Q 8 生産量[mg/L]を1 0 倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

C o Q 8 の生成量は、コントロール株DH5 α /pEG400と比較し、DH5 α /pAD0-1、DH5 α /pDXS-1およびDH5 α /pXSE-1では有意に高かった。特に、実施例1で取得したDNAを全て導入したDH5 α /pAD0-1において最も高い生産性が得られた。

(2) M9培地を10ml入れた試験管に、上記(1)で取得した*E. coli* DH5 α /pDXS-1または*E. coli* DH5 α /pEG400をそれぞれ植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

培養終了後、上記(1)と同様の方法により形質転換体によるC o Q 8 の生産量を算定した。

結果を第2表に示す。

表 2

大腸菌形質転換株のC o Q 8 生産

形質転換株	生育量 [OD660]	CoQ8生産量 [mg/L]	菌体内含量 ^{*1}
<i>E. coli</i> DH5 α /pEG400	3.1	0.49	1.6
<i>E. coli</i> DH5 α /pDXS-1	2.5	1.02	4.1

* 1 : 菌体内含量はC o Q 8 生産量[mg/L]を1 0 倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

C o Q 8 の生成量は、コントロール株DH5 α /pEG400と比較し、DH5 α /pDXS-1

では有意に高かった。

(3) 組換え大腸菌によるC o Q 8の生産

実施例1で取得したプラスミドp E G Y M 1またはコントロールとしてp E G 4 0 0をE. coli DH5 α 株に導入し、100 μ g/ml濃度のスペクチノマイシンに抵抗性を示す形質転換体E. coli DH5 α /pEGYM1およびE. coli DH5 α /pEG400を各々取得した。

グルコース1%、ビタミンB₁ 100mg/l、ビタミンB₆ 100mg/l、p-ハイドロキシ安息香酸 50mg/l添加したLB培地を10ml入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

培養終了後、上記(1)と同様の方法により形質転換体によるC o Q 8の生産量を算定した。

結果を第3表に示す。

表 3

大腸菌形質転換株のC o Q 8生産

形質転換株	生育量 [OD660]	CoQ8生産量 [mg/L]	菌体内含量 ^{*1}
E. coli DH5 α /pEG400	14.44	0.83	0.57
E. coli DH5 α /pEGYM1	13.12	0.94	0.71

*1: 菌体内含量はC o Q 8生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

C o Q 8の生成量は、コントロール株DH5 α /pEG400と比較し、DH5 α /pEGYM1では有意に高かった。

(実施例3) 組換え大腸菌によるメナキノン-8(MK-8)の生産

(1) スペクチノマイシンを100 μ g/ml添加したTB培地〔バクトトリブトン(ディフコ社製) 12g、酵母エキス(ディフコ社製) 24g、グリセロール 5gを水900mlに溶解し、KH₂PO₄を0.17M、K₂HPO₄を0.72M含有する水溶液を100ml加えて調製した培地〕を10ml入れた試験

管に、実施例 2 (1) で取得した、*E. coli* DH5 α /pAD0-1または*E. coli* DH5 α /pEG400をそれぞれ植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

培養終了後、実施例 2 (1) のC o Q 8の定量法と同様の方法によりMK-8を定量し、形質転換体によるMK-8の生産量を算定した。

結果を第 4 表に示す。

表 4

大腸菌形質転換株のMK-8生産

形質転換株	生育量 [OD660]	MK-8生産量 [mg/L]	菌体内含量 ^{*1}
<i>E. coli</i> DH5 α /pEG400	23.2	1.1	0.46
<i>E. coli</i> DH5 α /pAD0-1	23.5	1.8	0.75

* 1 : 菌体内含量はC o Q 8生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

MK-8の生産量は、コントロール株DH5 α /pEG400と比較して、DH5 α /pAD0-1では有意に高かった。

(2) 実施例 2 (1) で取得した*E. coli* DH5 α /pDXS-1または*E. coli* DH5 α /pEG400を、上記(1)と同様の方法で培養し、形質転換体によるMK-8の生産量を算定した。

結果を第 5 表に示す。

表 5

大腸菌形質転換株のMK-8生産

形質転換株	生育量 [OD660]	MK-8生産量 [mg/L]	菌体内含量 ^{*1}
<i>E. coli</i> DH5 α /pEG400	42.8	2.41	0.56
<i>E. coli</i> DH5 α /pDXS-1	44.0	2.96	0.67

* 1 : 菌体内含量はC o Q 8生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

MK-8の生産量は、コントロール株DH5 α /pEG400と比較して、DH5 α /pDXS-1では有意に高かった。

(実施例4) Erwinia carotovoraによるC o Q 8の生産

実施例1で取得したプラスミドpDXS-1またはコントロールとしてpEG400をErwinia carotovora IF0-3380株に導入し、100 μ g/ml濃度のスペクチノマイシンに抵抗性を示す形質転換体IF0-3380/pDXS-1およびIF0-3380/pEG400を取得した。

スペクチノマイシンを100 μ g/ml添加したLB培地を10ml入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

培養終了後、実施例2(1)と同様の方法により形質転換体によるC o Q 8の生産量を算定した。

結果を第6表に示す。

表6

Erwinia carotovora形質転換株によるC o Q 8生産

形質転換株	生育量 OD660	CoQ8生産量 mg/L	菌体内含量 ^{*1}
IF0-3380/pEG400	1.68	0.26	1.5
IF0-3380/pDXS-1	2.48	0.45	1.8

*1: 菌体内含量はC o Q 8生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

C o Q 8の生成量は、コントロール株IF0-3380/pEG400と比較し、IF0-3380/pDXS-1では有意に高かった。

(実施例5) Erwinia uredovoraによるコビキノンおよびカロテノイドの生産

実施例1で取得したプラスミドpUCYM-1、pQEDXS-1、pQEYM-1またはコントロールとしてpUC19およびpQE30をエレクトロポレーション法によりErwinia uredovora a DSM-30080株に導入し、100 μ g/ml濃度のアンピシリンに抵抗性を示す形質転換体E. uredovora DSM-30080/pUCYM-1、E. uredovora DSM-30080/pQEDXS-1、E. uredovora DSM-30080/pQEYM-1、E. uredovora DSM-30080/pUC19およ

びE. uredovora DSM-30080/pQE30を取得した。

アンピシリン 100 μ g/ml、グルコース1%、ビタミンB₁ 100 mg/l、ビタミンB₆ 100 mg/l、p-ハイドロキシ安息香酸 50 mg/l 添加したLB培地を10 ml入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

培養終了後、実施例2(1)と同様の方法により形質転換体によるC_oQ₈の生産量を算定した。

カロテノイド色素の生産量は、実施例2(1)と同様の方法により得られた2-ブタノール層を分光光度計を用い、450 nmの吸光度を測定することにより算出した。

結果を第7表に示す。

表 7

E. uredovora 形質転換株によるC_oQ₈およびカロテノイド生産

形質転換株	生育量 OD ₆₆₀	CoQ ₈		カロテノイド	
		生産量 mg/L	菌体内含量比 相対値	生産量 相対値	菌体内含量比 相対値
DSM-30080/pUC19	2.00	1.15	1.0	1.0	1.0
DSM-30080/pUCYM-1	1.88	1.39	1.3	1.5	1.6
DSM-30080/pQE30	2.52	1.29	1.0	1.0	1.0
DSM-30080/pQEYM-1	1.92	1.36	1.4	1.7	2.2
DSM-30080/pQEDXS-1	2.12	3.21	3.0	5.6	6.7

C_oQ₈の生産量およびカロテノイド色素の生産量ともに、コントロール株DSM-30080/pUC19と比較し、DSM-30080/pUCYM-1では有意に高かった。

同様に、C_oQ₈の生産量およびカロテノイド色素の生産量ともに、コントロール株DSM-30080/pQE30と比較し、DSM-30080/pQEYM-1およびDSM-30080/pQEDXS-1では有意に高かった。

(実施例6) 光合成細菌 Rhodobacter sphaeroidesからのイソプレノイド化

では有意に高かった。

(実施例 6) 光合成細菌 Rhodobacter sphaeroides からのイソプレノイド化合物の生合成に関与する蛋白質をコードする DNA の取得

(1) R. sphaeroides からの DXS 遺伝子の取得

大腸菌で見出された DXS 遺伝子配列を用いて、他生物種で保存されている DXS ホモログを genbank より検索した。その結果、Haemophilus influenzae (P45205)、Rhodobacter capsulatus (P26242)、Bacillus subtilis (P54523)、Synechocystis sp. PCC6803 (P73067) および Mycobacterium tuberculosis (007184) 等でホモログが見出された。これら配列を比較して、高度に保存されているアミノ酸配列を選択した。保存アミノ酸配列に対応する塩基配列を R. sphaeroides のコドン使用頻度を考慮にいれて設計し、センスプライマーとして配列番号 32 および配列番号 33 に記載の塩基配列を有する DNA 断片を、アンチセンスプライマーとして配列番号 34 を有する DNA 断片を DNA 合成機を用いて合成した。

R. sphaeroides KY4113 株 (FERM-P4675) の染色体 DNA を鋳型として、上記プライマーと、Expand™ High-Fidelity PCR System (ベーリンガー・マンハイム社製) を用い、DNA Thermal Cycler (パーキンエルマージャパン社製) で PCR を行った。

PCR は、94℃ で 40 秒間、60℃ で 40 秒間、72℃ で 1 分間からなる反応工程を 1 サイクルとして、30 サイクル行った後、72℃ で 7 分間反応させる条件で行い、目的とする DNA 断片を取得した。この DNA 断片を DIG DNA Labeling Kit (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて DIG 標識した。

R. sphaeroides の DXS 遺伝子全長を取得するため、KY4113 株のゲノムライブラリーを作成した。KY4113 株を LB 培地で一晩培養し、染色体 DNA を抽出した。制限酵素 Sau 3 AI で部分消化してショ糖密度勾配超遠心法により 4~6 kb の DNA 断片を精製した。該 DNA 断片と Bam HI 消化したベクター pUC19 を Ligation Pack (ニッポンジーン社製) を用いて連結し、大腸菌 DH5α に形質転換した。形質転換体をアンピシリン 100 μg/ml を含む LB プレートに塗布し、約 10000 個のコロニーを得た。

検出された。各々をシークエンスしたところ、それぞれのDNA断片から他生物種の既知DXS遺伝子と相同性の高いORFが見出された。配列番号26に示すアミノ酸配列をDXS1、配列番号27に示すアミノ酸配列をDXS2と命名した。

(2) 大腸菌DXS遺伝子欠損株を用いた相補性確認

① 大腸菌DXS遺伝子欠損株の取得

E. coli W3110株 (ATCC14948) を、LB液体培地に植菌し、対数増殖期まで培養した。培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得した。

該菌体を、0.05Mトリス・マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) で洗浄後、菌体濃度が 10^9 細胞/mlになるように同緩衝液に懸濁した。

該懸濁液にNTGを終濃度が600mg/lになるように加え、室温で20分間保持して変異処理を行った。

得られた変異処理菌体を1-デオキシキシルロース0.1%を含むM9最少寒天培地〔モレキュラー・クロニング 第二版〕プレートに塗布して培養した。

1-デオキシキシルロースは、J. C. S. Perkin Trans 1, 2131-2137 (1982)に記載の方法に準じて化学合成した。

1-デオキシキシルロース0.1%を含むM9最少寒天培地上で生育してきたコロニーを、M9最少寒天培地と1-デオキシキシルロースを0.1%含むM9最少寒天培地にレプリカし、1-デオキシキシルロースを0.1%含むM9最少寒天培地では生育できるが、M9最少寒天培地では生育できない、1-デオキシキシルロース要求性を示す株を目的の変異株として選択した。

該方法で選択され、取得された変異株をME1株と命名した。

該ME1株にpDXS-1を導入したところ、1-デオキシキシルロース要求性を相補したことから、ME1株はDXS遺伝子が欠損した株であると判断した。

(3) DXS1およびDXS2の相補性試験

KY4113株由来の、配列番号27からなるDXS1をコードするDNA断片、および配列番号29からなるDXS2をコードするDNA断片を各々ベクターpUC19のlacプロモーター下流に連結したプラスミドを構築した。

これら構築したプラスミドをそれぞれME 1株に導入したところ、DXS 1およびDXS 2いずれもME 1株の1-デオキシキシルコース要求性を相補した。

以上のことから、R. sphaeroidesはビルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシルコース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有するDXS 1およびDXS 2のDXS遺伝子を2つ持つことが判明した。

(4) R. sphaeroides由来メチルエリスリトール要求性相補遺伝子の取得

実施例1(2)①で得られた大腸菌メチルエリスリトール要求性変異株ME 7株を、メチルエリスリトール0.1%含むLB液体培地に植菌して対数増殖期まで培養した後、遠心分離して菌体を回収した。

該菌体を10%グリセロールを含む1mM HEPES水溶液で2回洗浄して培地成分を可能な限り除去した。

該洗浄菌体に、実施例6(1)で作成したR. sphaeroides KY4113株のゲノムライブラリーから抽出したプラスミドを、常法に従い、エレクトロポレーションにより導入した。

導入後、アンピシリン100μg/lを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

生育してきたコロニーを釣菌し、LB液体培地に植菌して培養し、該培養菌体よりプラスミドを抽出した。

抽出したプラスミドをME 7株に再導入したところ、メチルエリスリトールを含まない培地でも生育したことから、抽出したプラスミドにR. sphaeroides由来のメチルエリスリトール要求性を相補するDNA断片が含まれていることを確認した。

本DNA断片の塩基配列を決定した結果、配列番号31からなる、大腸菌yaeMと相同性の高いアミノ酸配列をコードするDNA配列が見出された。

(実施例7) 組換え光合成細菌によるユビキノーン10(CoQ10)の生産

実施例6で取得した配列番号27からなるDNA断片DXS 1および配列番号29からなるDNA断片DXS 2の上流に、KY4113株由来のglnBプロモーターを

連結し、広宿主域ベクターpEG400に挿入して作成したプラスミドをpRSDX-1およびpRSDX-2と命名した。また、yaeMとDXS1をタンデムに連結し、glnBプロモーター下流に連結したプラスミドを構築し、pRSYMDX1と命名した。これらプラスミドを、エレクトロポレーション（Bio-Rad社製）により*R. sphaeroides* KY4113株に導入した。

導入後、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のスペクチノマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、 30°C で3日間培養した。

生育してきたコロニーを $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のスペクチノマイシンを含むLB培地に植菌して一晚培養後、培養菌体を遠心分離により回収した。

得られた菌体よりプラスミド抽出（Qiagen社製）し、各々導入したプラスミドを保持していることを確認した。このようにして得られた形質転換体をKY4113/pRSDX-1、KY4113/pRSDX-2、KY4113/pRSYMDX1およびKY4113/pEG400と命名した。

種培地（グルコース 2%、ペプトン 1%、酵母エキス 1%、NaCl 0.5%（pH 7.2、NaOHで調整））を5ml入れた試験管に各形質転換体を一白金耳植菌し、 30°C で24時間培養した。

得られた培養液0.5mlを、ユビキノール10生産培地（廃糖蜜 4%、グルコース 2.7%、コーンスチープリカー 4%、硫酸アンモニウム 0.8%、リン酸1カリウム 0.05%、リン酸2カリウム 0.05%、硫酸マグネシウム・7水和物 0.025%、硫酸第一鉄・7水和物 $3\text{mg}/\text{l}$ 、チアミン $8\text{mg}/\text{l}$ 、ニコチン酸 $8\text{mg}/\text{l}$ 、トレースエレメント $1\text{ml}/\text{l}$ を含む培地をpH 9に調整後、炭酸カルシウム 1%を添加してオートクレーブ滅菌したもの）を5ml入れた試験管に添加し、 30°C で5日間振盪培養した。

培養終了後実施例2（1）のCoQ8の定量法と同様の方法により、形質転換体によるCoQ10の生産量を算定した。結果を表8に示す。

（本頁以下余白）

表 8

	生育量[OD660]	CoQ10蓄積量[mg/l]
KY4113/pEG400	23.7	65.2
KY4113/pRSDX-1	23	81
KY4113/pRSDX-2	24.4	81.9
KY4113/pRSYMDX1	25.8	117.9

CoQ10生成量は、コントロール株KY4113/pEG400と比較しKY4113/pRSDX-1、KY4113/pRSDX-2およびKY4113/pRSYMDX1では有意に高かった。

(実施例 8) yaeM遺伝子がコードする酵素の活性測定

(1) yaeM遺伝子の高発現化

y a e M遺伝子を十分発現させるような組換え体プラスミドをPCR法 [Science, 230, 1350 (1985)] を用いて下記方法により構築した。

配列番号 24 に示した配列を有するセンスプライマーおよび配列番号 25 に示した配列を有するアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成した。

該センスプライマーおよびアンチセンスプライマーの5'末端にはそれぞれB a m H I の制限酵素サイトを付加させた。

染色体DNAを鋳型として、これらプライマーおよびTag DNA polymerase (ベーリンガー社製) を用い、DNA Thermal Cycler (パーキンエルマージャパン社製) でPCRを行うことによりy a e M遺伝子を増幅した。

PCRは、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルと30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件で行った。

増幅されたDNA断片およびpUC118 (宝酒造社製) を制限酵素B a m H I で消化後、各々のDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって精製した。

これら精製された両断片を混合した後エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5 μ l の蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。

該組換え体DNAがy a e M遺伝子であることをDNA配列を決定することに

よって確認した。

該組換え体からプラスミドを抽出し、制限酵素制限酵素 B a m H I で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い B a m H I 処理 y a e M 遺伝子含有 DNA 断片を取得した。

pQE30 (QIAGEN社製) を制限酵素 B a m H I で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い B a m H I 処理 pQE30 断片を取得した。

上記で取得された B a m H I 処理 y a e M 遺伝子含有 DNA 断片を B a m H I 消化 pQE30 断片と混合した後、エタノール沈殿を行い、得られた DNA 沈殿物を 5 μ l の蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体 DNA を取得した。

該組換え体 DNA を用い、E. Coli JM109 株を常法に従って形質転換後、該形質転換体をアンピシリン 100 μ g / m l を含む L B 寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

上記と同様の方法で、該大腸菌よりプラスミドを単離した。

上記同様、該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、塩基配列を決定することにより、目的の DNA 断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。このプラスミドを pQEDXR と命名した。

(2) y a e M 遺伝子産物の活性測定

① y a e M 遺伝子産物の精製

(1) で作成した pQEDXR を常法により pREP4 を有する E. coli M15 株 (QIAGEN 社製) に導入し、アンピシリン 200 μ g / m l、カナマイシン 25 μ g / m l に耐性を示す M15 / pREP4 + pQEDXR 株を得た。

M15 / pREP4 + pQEDXR 株をアンピシリン 200 μ g / m l、カナマイシン 25 μ g / m l を含む L B 液体培地 100 m l 中、37℃で培養し、660 n m の濁度が 0.8 に達した時点でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度 0.2 m M になるように添加した。さらに 37℃で5時間培養した後、遠心分離 (3000 r p m、10 分間) によって培養上清を除いた。この菌体を 100 m M トリス塩酸緩衝液 (p H 8.0) 6 m l に懸濁し、超音波破碎機 (SONIFIER, BRANSON 社製) を用いて

氷冷しつつ破碎した。得られた菌体破碎液を遠心分離（10,000rpm、20分間、4℃）にかけ、上清を回収した。この細胞抽出液遠心上清をNi-NTAレジソカラム（QIAGEN社製）に通し、20mlの洗浄緩衝液〔100mM トリス塩酸（pH8.0）、50mM イミダゾール、0.5% Tween20〕で洗浄した。ついで溶出緩衝液〔100mM トリス塩酸（pH8.0）、200mM イミダゾール〕10mlを通塔し、溶出液を1mlずつ分画した。

各分画について蛋白量を測定（BioRad社の蛋白量定量キット使用）し、蛋白質を含む画分を精製蛋白画分とした。

② 基質1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸の調製

反応基質である1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸は以下のようにして調製した。1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸の検出は、HPLC〔カラム：Senshu pak NH2-1251-N（4.6 x 250mm、Senshu社製）、移動層：100mM KH_2PO_4 （pH3.5）〕によって195nmの吸光度を測定する方法で行った。

大腸菌のdxs遺伝子を高発現するプラスミドpQDXS-1を上記と同様にE. coli M15/pREP4株に導入し、M15/pREP4+pQDXS-1株を得た。

該株を実施例8（2）①と同様に培養し、Ni-NTAレジソカラムを用いてdxs酵素蛋白質を精製した。

該精製dxs蛋白質を20mlの反応液〔100mM トリス塩酸（pH7.5）、10mM ピルビン酸ナトリウム、30mM DL-グリセルアルデヒド-3-リン酸、1.5mM チアミンピロリン酸、10mM MgCl_2 、1mM DL-ジチオスレイトール〕に加え37℃で保温した。

12時間反応した後、反応液を水で300mlに希釈し、活性炭カラム（2.2 x 8cm）を通した後、Dowex 1-X8（C1-型、3.5 x 25cm）に通塔し、1%食塩水で溶出した。溶出画分を濃縮後、Sephadex G-10（1.8 x 100cm）に通塔し、水で溶出した。1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸含有画分を凍結乾燥し、約50mgの白色粉末を得た。

該粉末が1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸であることをNMR分析（A-500、日本電子社製）で確認した。

③ yaeM遺伝子産物の酵素活性測定

100 mM トリス塩酸 (pH 7.5)、1 mM MgCl₂、0.3 mM NADPHと実施例8(2)①で得た yaeM 遺伝子産物を含む反応液 1 ml に、上記のように合成した 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸 0.3 mM (終濃度) を加え、37℃でインキュベートした。インキュベート中の NADPH の増減を 340 nm の吸光を分光光度計 (UV-160、島津社製) で測定する方法で追跡したところ、経時的に NADPH が減少することが分かった。

上記反応産物の構造を確認するため、以下のようにスケールを大きくして反応を行い、産物を単離した。1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸の濃度を 0.15 mM とした以外は上記と同じ組成の反応液 200 ml を、同様に 37℃で30分間インキュベートした後、その全量を活性炭カラムに通し、通過液を水で1 L に希釈した後、Dowex 1-X8 (Cl-型、3.5 x 20 cm) カラムに通塔した。

1%食塩水 400 ml で溶出し、Sephadex G-10 (1.8 x 100 cm) に通塔し、水で溶出した。溶出画分を凍結乾燥することで、反応産物を単離した。

HR- FABMS 解析から単離された反応産物の分子式は C₅H₁₂O₇P [m/z 215.0276 (M-H)⁻、Δ-4.5 mmu] と推定された。¹H および ¹³C NMR 解析から、以下のケミカルシフトが得られた。

¹H NMR(D₂O, 500 MHz): δ 4.03(ddd, J=11.5, 6.5, 2.5 Hz, 1H), 3.84(ddd, J=11.5, 8.0, 6.5 Hz, 1H), 3.78(dd, J=8.0, 2.5 Hz, 1H), 3.60(d, J=12.0 Hz, 1H), 3.50(d, J=12.0 Hz, 1H), 1.15(s, ³H); ¹³C NMR(D₂O, 125 MHz): δ 75.1(C-2), 74.8(C-3), 67.4(C-1), 65.9(C-4), 19.4(2-Me)

この反応産物をアルカリ性ホスファターゼ(宝酒造社製)で処理して得られる化合物を¹Hおよび¹³C NMR解析して得られるケミカルシフトは、Tetrahedron Letter, 38, 6184 (1997)に記載の方法で合成した2-C-メチル-D-エリトリールのNMR解析で得られるケミカルシフトと完全に一致した。

さらに前者の旋光度は [α]_D²¹=+6.0 (c=0.050, H₂O) で、報告されている [Tetrahedron Letter, 38, 6184 (1997)] 2-C-メチル-D-エ

リスリトールの旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +7.0$ ($c=0.13$, H_2O) と一致した。

これらの結果から、y a e M 遺伝子産物の反応産物は 2-C-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸であることが明らかになった。即ち、y a e M 遺伝子産物は NADPH の消費を伴いながら 1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸から 2-C-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸を生じる活性を有することが判明した。この触媒活性に基づき、本酵素を 1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸レダクトイソメラーゼと命名した。

④ 1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸レダクトイソメラーゼの性質
実施例 8 (2) ③に記した 1 ml 反応系を用いて、1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸レダクトイソメラーゼの酵素学的性質を調べた。なお 1 u とは 1 分間に 1 mmol の NADPH を酸化する活性と定義する。

NADPH を NADH に置換した場合、活性は 1/100 以下に低下した。

1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸の代りに 1-デオキシ-D-キシルロースを用いると全く反応は起らなかった。

SDS-PAGE 解析から、本酵素は 42 kDa ポリペプチドから構成されていることが分かった。

反応系への金属添加効果を第9表に示した。

(本頁以下余白)

表 9

1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸レダクトイソメラーゼ
活性に及ぼす各種金属イオンの影響

添加物	比活性 (units/mg protein)
なし	0.3
EDTA	N. D.
MnCl ₂	11.8
CoCl ₂	6.0
MgCl ₂	4.0
CaCl ₂	0.2
NiSO ₄	0.2
ZnSO ₄	0.3
CuSO ₄	N. D.
FeSO ₄	N. D.

各種金属イオンおよび EDTA は 1mM になるように添加した。
N. D. は活性が検出できなかったことを示す。

MnCl₂存在下での 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸、NADPH への K_m は、それぞれ 249 μM、7.4 μM だった。

反応温度の影響を図 1 に、反応 pH の影響を図 2 に示した。

(実施例 9) yaeM 欠損変異株の作成と性質

(1) yaeM 欠損変異株の作成

1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸レダクトイソメラーゼが細胞の生育に必須か否かを調べるため、以下のようにしてその欠損変異株を作成した。

yaeM 遺伝子中に挿入するためのカナマイシン耐性遺伝子カセットを以下のようにして作成した。

実施例 1 (2) ②で得たプラスミド pMEW41 を制限酵素 Ba1 I で消化後アガロースゲル電気泳動し、Bai I I 処理 DNA 断片を取得した。

Tn5 を制限酵素 Hi nd I I I と Sa m I で消化した後、DNA blunting kit

(宝酒造社製)を用いて断片の末端を平滑化した。

得られた平滑化DNA断片を先に作成したB a i I処理pMEW41DNA断片と混合した後、エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5 μ lの蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。

該組換え体DNAを用い、E. coli JM109株(宝酒造より購入)を常法に従って形質転換後、該形質転換体をアンピシリン100 μ g/mlとカナマイシン15 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。

生育してきたアンピシリン耐性の形質転換体のコロニー数個について、アンピシリン100 μ g/mlとカナマイシン15 μ g/mlを含むLB液体培地10mlで37 $^{\circ}$ C 16時間振盪培養した。

得られた培養液を遠心分離することにより菌体を取得した。

該菌体より常法に従ってプラスミドを単離した。

該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、目的のDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。このプラスミドをpMEW41Kmと名づけた。

pMEW41Kmを用いて、相同組換えによる染色体上のyaeM遺伝子の破壊を行った。組換えの模式図を図3に示した。

pMEW41Kmを制限酵素H i n d I I IとS a c Iで消化し、アガロースゲル電気泳動を行い直鎖状の断片を精製した。この断片を用いて常法に従って、大腸菌FS1576株を形質転換した。FS1576株は国立遺伝学研究所よりME9019株の名で入手可能である。該形質転換体をカナマイシン15 μ g/mlと2-C-メチル-D-エリスリトール1g/lを含むLB寒天培地に塗布し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。

生育してきたカナマイシン耐性コロニー数個について、カナマイシン15 μ g/mlと2-C-メチル-D-エリスリトール1g/lを含むLB液体培地10mlで37 $^{\circ}$ C 16時間振盪培養した。

得られた培養液を遠心分離することにより菌体を取得した。

該菌体より常法に従って染色体DNAを単離した。

染色体DNAを制限酵素S m a IまたはP s t Iで消化した。またFS1576株の

染色体についても同様に処理した。常法に従って、これら制限酵素処理DNAをアガロースゲル電気泳動後、カナマイシン耐性遺伝子およびyaeM遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析に供した。その結果、カナマイシン耐性コロニーの染色体は図3に示した構造をとっており、目的どおりyaeM遺伝子がカナマイシン耐性遺伝子で分断破壊されていることが確かめられた。

(2) yaeM欠損変異株の性質

上記の手順で作成されたyaeM欠損株およびその親株であるFS1576株を、LB寒天培地および2-C-メチル-D-エリスリトール1g/lを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で培養した。2日後の生育度合いを第10表に示した。

表10

大腸菌の生育に対するyaeM遺伝子の欠損の影響

菌株	各培地上での菌の生育 ^{*1}	
	LB	LB+ME ^{*2}
FS1576	+	+
yaeM欠損株	—	+

*1：生育度合い +；良好に生育、—；生育せず

*2：MEは2-C-メチル-D-エリスリトール 1g/l 添加を表す。

yaeM欠損変異株は2-C-メチル-D-エリスリトールを添加しない培地では生育できないため、2-C-メチル-D-エリスリトール非存在下では本遺伝子が細胞の生育に必須であることが明白となった。

(実施例10) 1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼ阻害剤が菌の生育に及ぼす効果

1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸レダクトイソメラーゼ反応の産物である2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸やこの酵素反応で想定される反応中間体とフォスミドマイシンは構造的に似ているため、フォスミドマイシンが該酵素を阻害する可能性があるとの推定の基に以下の実験をおこなった。

実施例 8 に示した 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸レダクトイソメラーゼ活性測定系にフォスミドマイシンを添加し、酵素活性への影響を調べた。

フォスミドマイシンは [Chem. Pharm. Bull., 30, 111-118 (1982)] に記載の方法に従って合成した。

実施例 8 (2) ③ に示した反応系を 0.2 ml にスケールダウンした系 (各濃度は同じ) に各種濃度のフォスミドマイシンを添加し、37℃でインキュベートし、NADPH の増減をベンチマークマイクロプレートリーダー (バイオラド社製) を用いて測定した。

図 4 に示したように、フォスミドマイシンは 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸レダクトイソメラーゼを阻害することが判った。

大腸菌 W3110 株を LB 寒天培地、フォスミドマイシンを 3.13 mg/l 含む LB 寒天培地およびフォスミドマイシン 3.13 mg/l と 2-C-メチル-D-エリスリトール 0.25 g/l を含む LB 寒天培地にそれぞれ塗布し、37℃で培養した。

培養 2 日後において、LB 寒天培地、フォスミドマイシンおよび 2-C-メチル-D-エリスリトール 0.25 g/l を含む LB 寒天培地上の 2 種類の培地では菌は生育することができたが、フォスミドマイシンだけを添加した LB 寒天培地では菌は生育することができなかった。

これらの結果から、フォスミドマイシンが 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸レダクトイソメラーゼを阻害することによって菌の生育を阻害することが明白となった。以上のことから、 γ -a-e-M (1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸レダクトイソメラーゼ) の活性を阻害する物質は有効な抗菌剤あるいは除草剤となり得る。

本明細書中で引用した全ての文献は、そのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、心疾患、骨粗鬆症、止血、がん予防、免疫賦活等を目的とした医薬品、健康食品および貝類付着防止塗料等に有用なイソプレノイド化合物の生合成に関与するDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の製造方法、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、該蛋白質の製造方法、および該蛋白質、ならびに1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する新規な酵素蛋白質および該酵素を阻害する物質を探索することによる、抗菌およびまたは除草活性を有する化合物の探索方法を提供することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号12：合成DNA
配列番号13：合成DNA
配列番号14：合成DNA
配列番号15：合成DNA
配列番号16：合成DNA
配列番号17：合成DNA
配列番号18：合成DNA
配列番号19：合成DNA
配列番号20：合成DNA
配列番号21：合成DNA
配列番号22：合成DNA

配列番号 2 3 : 合成 DNA

配列番号 2 4 : 合成 DNA

配列番号 2 5 : 合成 DNA

配列番号 3 2 : 合成 DNA

配列番号 3 3 : 合成 DNA

配列番号 3 4 : 合成 DNA

請 求 の 範 囲

1. 以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e) および (f) から選ばれる DNA を 1 つ以上含む DNA をベクターに組み込み、得られた組換え体 DNA を原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の製造方法。

(a) ビルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードする DNA

(b) ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードする DNA

(c) 配列番号 3 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードする DNA

(d) 配列番号 4 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードする DNA

(e) 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸から 2-C-メチル-D-エリスリトール 4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードする DNA

(f) (a)、(b)、(c)、(d) および (e) から選ばれる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ選ばれた DNA にコードされた蛋白質が有する活性と実質的に同一の活性を有している蛋白質をコードする DNA

2. ビルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシロース 5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードする D

NAが、配列番号1、26および28いずれかに記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつビルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNAである、請求項1記載の製造方法。

3. DNAが、配列番号6、27および29いずれかに記載の塩基配列を有するDNAである、請求項1または2記載の製造方法。

4. ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするDNAが、配列番号2記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするDNAである、請求項1記載の製造方法。

5. DNAが、配列番号7記載の塩基配列を有するDNAである、請求項1または4記載の製造方法。

6. 1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNAが、配列番号5または30に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNAである、請求項1記載の製造方法。

7. DNAが、配列番号10または31に記載の塩基配列を有するDNAである、請求項1または6記載の製造方法。

8. DNAが、配列番号8または9記載の塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAである、請求項1記載の製造方法。

9. イソプレノイド化合物が、ユビキノン、ビタミンK₂およびカロテノイドか

ら選ばれるイソプレノイド化合物である、請求項 1 記載の製造方法。

10. 以下の (a)、(b) および (c) から選ばれるイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質。

(a) 配列番号 3 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号 4 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質

(c) 配列番号 5 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質

11. 請求項 10 記載の蛋白質をコードする DNA をベクターに組み込み、得られた組換え体 DNA を宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することとを特徴とする、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質の製造方法。

12. 形質転換体が、Escherichia 属に属する微生物、Rhodobacter 属に属する微生物または Erwinia 属に属する微生物である、請求項 1 または 11 記載の製造方法。

13. 以下の (a) ~ (g) いずれかに記載の、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(a) 配列番号 3 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA

(b) 配列番号 4 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA

(c) 配列番号 5 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA

(d) 配列番号 8 記載の塩基配列を有する DNA

(e) 配列番号 9 記載の塩基配列を有する DNA

(f) 配列番号 10 記載の塩基配列を有する DNA

(g) (a) ~ (f) いずれかに記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

14. ビルビン酸とグリセルアルデヒド3リン酸より1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸を生合成した後、2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸の生合成を経由しイソペンテニルピロリン酸を生合成するための非メバロン酸経路上に存在する酵素から選ばれる酵素の有する活性を有している蛋白質の反応を阻害する物質を探索することを特徴とする抗菌活性を有する物質の探索方法。

15. ビルビン酸とグリセルアルデヒド3リン酸より1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸を生合成した後、2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸の生合成を経由しイソペンテニルピロリン酸を生合成するための非メバロン酸経路上に存在する酵素から選ばれる酵素の有する活性を有している蛋白質の反応を阻害する物質を探索することを特徴とする除草活性を有する物質の探索方法。

16. 蛋白質が、以下の(a)または(b)の蛋白質であることを特徴とする、請求項14または15記載の探索方法。

(a) ビルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質

(b) 1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質

17. ビルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質が、配列番号1記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつビルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質である、請求項16記載の探索方法。

18. 1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質が、配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列

において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質である、請求項16記載の探索方法。

- 19. 請求項14記載の探索方法により取得される抗菌活性を有する物質。
- 20. 請求項15記載の探索方法により取得される除草活性を有する物質。
- 21. 請求項19記載の物質を含む抗菌剤。
- 22. 請求項20記載の物質を含む除草剤。

図 1

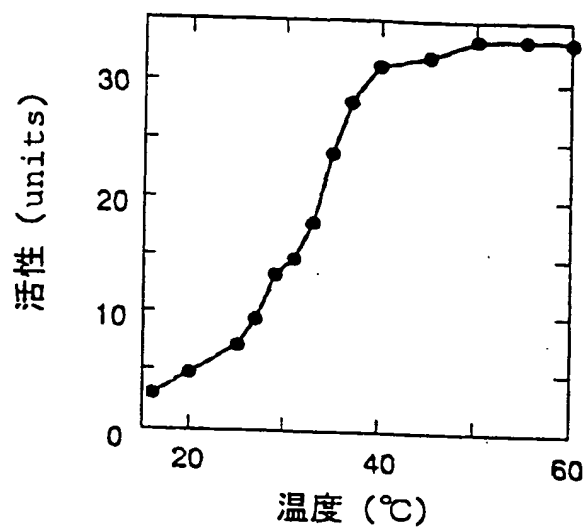


図 2

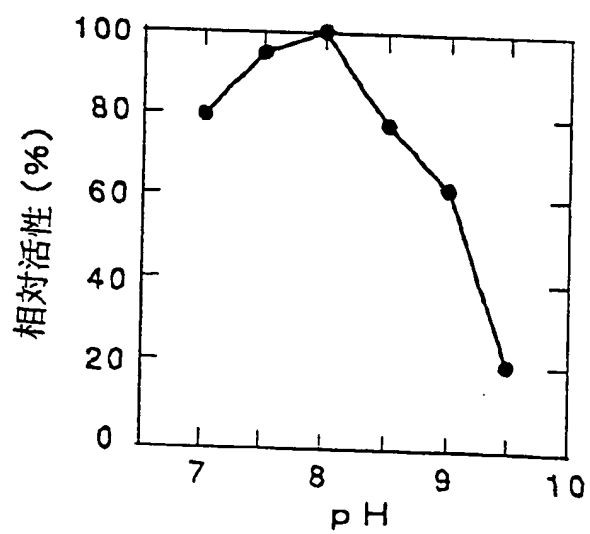


図 3

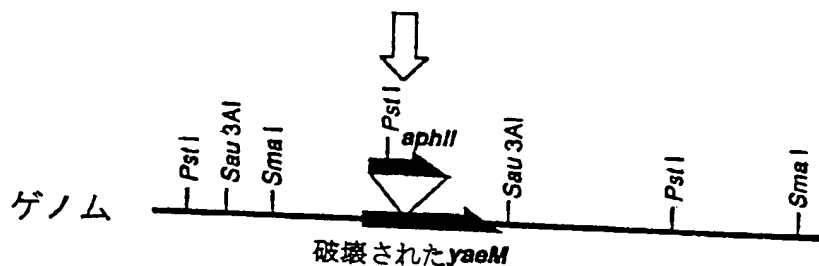
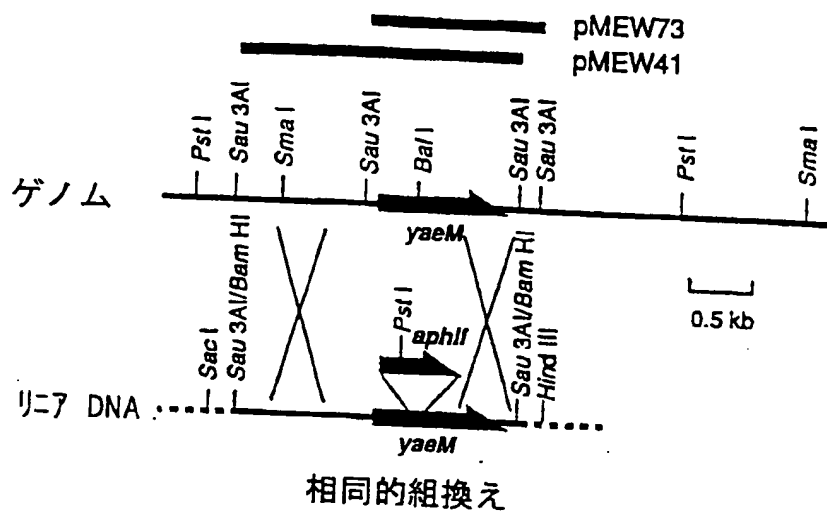
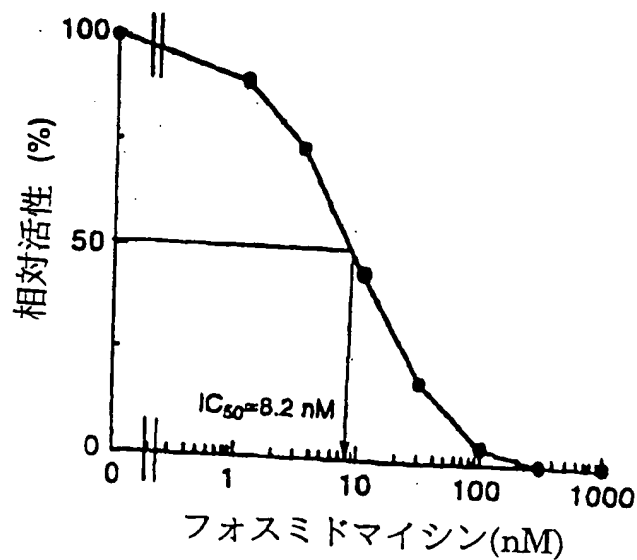


図 4



SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> A METHOD OF PRODUCING AN ISOPRENOID COMPOUND BY USING MICROORGANIS
M AND A METHOD OF SCREENING A COMPOUND HAVING ANTIBIOTIC OR WEED KILLER
ACTIVITY

<130> PH-635-PCT

<140>

<141>

<150> JP98/103101

<151> 1998-04-14

<150> JP98/221910

<151> 1998-08-05

<150> JP99/035739

<151> 1999-02-15

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 620

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser

1 5 10 15
 Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys
 20 25 30
 Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
 35 40 45
 His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His
 50 55 60
 Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His
 65 70 75 80
 Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly
 85 90 95
 Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu
 100 105 110
 Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser
 115 120 125
 Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg
 130 135 140
 Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala
 145 150 155 160
 Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val
 165 170 175
 Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu

180	185	190
Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu		
195	200	205
Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu		
210	215	220
Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly		
225	230	235 240
Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly		
245	250	255
His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu		
260	265	270
Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr		
275	280	285
Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe		
290	295	300
Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser		
305	310	315 320
Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp		
325	330	335
Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met		
340	345	350
Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile		

355	360	365
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly		
370	375	380
Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr		
385	390	395 400
Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe		
405	410	415
Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln		
420	425	430
Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile		
435	440	445
Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly		
450	455	460
Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn		
465	470	475 480
Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys		
485	490	495
Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly		
500	505	510
Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr		
515	520	525
Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu		

530 535 540
 Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala
 545 550 555 560
 Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His
 565 570 575
 Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile
 580 585 590
 Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala
 595 600 605
 Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala
 610 615 620

<210> 2

<211> 299

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln
 1 5 10 15
 Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val
 20 25 30
 Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg
 35 40 45

Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn
 50 55 60

Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg
 85 90 95

Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu
 100 105 110

Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala
 115 120 125

Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu
 130 135 140

Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu
 145 150 155 160

Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg
 165 170 175

Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu
 180 185 190

Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu
 195 200 205

Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp
 210 215 220

Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly
225 230 235 240

Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu
245 250 255

Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln
260 265 270

Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu
275 280 285

Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys
290 295

<210> 3

<211> 80

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 3

Met Pro Lys Lys Asn Glu Ala Pro Ala Ser Phe Glu Lys Ala Leu Ser
1 5 10 15

Glu Leu Glu Gln Ile Val Thr Arg Leu Glu Ser Gly Asp Leu Pro Leu
20 25 30

Glu Glu Ala Leu Asn Glu Phe Glu Arg Gly Val Gln Leu Ala Arg Gln
35 40 45

Gly Gln Ala Lys Leu Gln Gln Ala Glu Gln Arg Val Gln Ile Leu Leu
50 55 60

Ser Asp Asn Glu Asp Ala Ser Leu Thr Pro Phe Thr Pro Asp Asn Glu
 65 70 75 80

<210> 4

<211> 348

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Val Thr Gly Val Asn Glu Cys Ser Arg Ser Thr Cys Asn Leu Lys Tyr
 1 5 10 15

Asp Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Met Gln Tyr Asn Pro Leu Gly Lys
 20 25 30

Thr Asp Leu Arg Val Ser Arg Leu Cys Leu Gly Cys Met Thr Phe Gly
 35 40 45

Glu Pro Asp Arg Gly Asn His Ala Trp Thr Leu Pro Glu Glu Ser Ser
 50 55 60

Arg Pro Ile Ile Lys Arg Ala Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Phe Asp
 65 70 75 80

Thr Ala Asn Ser Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Glu Glu Ile Val Gly Arg
 85 90 95

Ala Leu Arg Asp Phe Ala Arg Arg Glu Asp Val Val Val Ala Thr Lys
 100 105 110

Val Phe His Arg Val Gly Asp Leu Pro Glu Gly Leu Ser Arg Ala Gln

115	120	125
Ile Leu Arg Ser Ile Asp Asp Ser Leu Arg Arg Leu Gly Met Asp Tyr		
130	135	140
Val Asp Ile Leu Gln Ile His Arg Trp Asp Tyr Asn Thr Pro Ile Glu		
145	150	155 160
Glu Thr Leu Glu Ala Leu Asn Asp Val Val Lys Ala Gly Lys Ala Arg		
165	170	175
Tyr Ile Gly Ala Ser Ser Met His Ala Ser Gln Phe Ala Gln Ala Leu		
180	185	190
Glu Leu Gln Lys Gln His Gly Trp Ala Gln Phe Val Ser Met Gln Asp		
195	200	205
His Tyr Asn Leu Ile Tyr Arg Glu Glu Glu Arg Glu Met Leu Pro Leu		
210	215	220
Cys Tyr Gln Glu Gly Val Ala Val Ile Pro Trp Ser Pro Leu Ala Arg		
225	230	235 240
Gly Arg Leu Thr Arg Pro Trp Gly Glu Thr Thr Ala Arg Leu Val Ser		
245	250	255
Asp Glu Val Gly Lys Asn Leu Tyr Lys Glu Ser Asp Glu Asn Asp Ala		
260	265	270
Gln Ile Ala Glu Arg Leu Thr Gly Val Ser Glu Glu Leu Gly Ala Thr		
275	280	285
Arg Ala Gln Val Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ser Lys Pro Gly Ile Ala		

290 295 300
 Ala Pro Ile Ile Gly Thr Ser Arg Glu Glu Gln Leu Asp Glu Leu Leu
 305 310 315 320
 Asn Ala Val Asp Ile Thr Leu Lys Pro Glu Gln Ile Ala Glu Leu Glu
 325 330 335
 Thr Pro Tyr Lys Pro His Pro Val Val Gly Phe Lys
 340 345

 <210> 5
 <211> 398
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

 <400> 5
 Met Lys Gln Leu Thr Ile Leu Gly Ser Thr Gly Ser Ile Gly Cys Ser
 1 5 10 15
 Thr Leu Asp Val Val Arg His Asn Pro Glu His Phe Arg Val Val Ala
 20 25 30
 Leu Val Ala Gly Lys Asn Val Thr Arg Met Val Glu Gln Cys Leu Glu
 35 40 45
 Phe Ser Pro Arg Tyr Ala Val Met Asp Asp Glu Ala Ser Ala Lys Leu
 50 55 60
 Leu Lys Thr Met Leu Gln Gln Gln Gly Ser Arg Thr Glu Val Leu Ser
 65 70 75 80

Gly Gln Gln Ala Ala Cys Asp Met Ala Ala Leu Glu Asp Val Asp Gln
 85 90 95

Val Met Ala Ala Ile Val Gly Ala Ala Gly Leu Leu Pro Thr Leu Ala
 100 105 110

Ala Ile Arg Ala Gly Lys Thr Ile Leu Leu Ala Asn Lys Glu Ser Leu
 115 120 125

Val Thr Cys Gly Arg Leu Phe Met Asp Ala Val Lys Gln Ser Lys Ala
 130 135 140

Gln Leu Leu Pro Val Asp Ser Glu His Asn Ala Ile Phe Gln Ser Leu
 145 150 155 160

Pro Gln Pro Ile Gln His Asn Leu Gly Tyr Ala Asp Leu Glu Gln Asn
 165 170 175

Gly Val Val Ser Ile Leu Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Phe Arg Glu
 180 185 190

Thr Pro Leu Arg Asp Leu Ala Thr Met Thr Pro Asp Gln Ala Cys Arg
 195 200 205

His Pro Asn Trp Ser Met Gly Arg Lys Ile Ser Val Asp Ser Ala Thr
 210 215 220

Met Met Asn Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Glu Ala Arg Trp Leu Phe Asn
 225 230 235 240

Ala Ser Ala Ser Gln Met Glu Val Leu Ile His Pro Gln Ser Val Ile
 245 250 255

His Ser Met Val Arg Tyr Gln Asp Gly Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly
 260 265 270

Glu Pro Asp Met Val Arg Gln Leu Pro Thr Pro Trp Ala Trp Pro Asn
 275 280 285

Arg Val Asn Ser Gly Val Lys Pro Leu Asp Phe Cys Lys Leu Ser Ala
 290 295 300

Leu Thr Phe Ala Ala Pro Asp Tyr Asp Arg Tyr Pro Cys Leu Lys Leu
 305 310 315 320

Ala Met Glu Ala Phe Glu Gln Gly Gln Ala Ala Thr Thr Ala Leu Asn
 325 330 335

Ala Ala Asn Glu Ile Thr Val Ala Ala Phe Leu Ala Gln Gln Ile Arg
 340 345 350

Phe Thr Asp Ile Ala Ala Leu Asn Leu Ser Val Leu Glu Lys Met Asp
 355 360 365

Met Arg Glu Pro Gln Cys Val Asp Asp Val Leu Ser Val Asp Ala Asn
 370 375 380

Ala Arg Glu Val Ala Arg Lys Glu Val Met Arg Leu Ala Ser
 385 390 395

<210> 6

<211> 1860

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1860)

<400> 6

```

atg agt ttt gat att gcc aaa tac ccg acc ctg gca ctg gtc gac tcc 48
Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser
  1             5             10             15
acc cag gag tta cga ctg ttg ccg aaa gag agt tta ccg aaa ctc tgc 96
Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys
      20             25             30
gac gaa ctg cgc cgc tat tta ctc gac agc gtg agc cgt tcc agc .ggg 144
Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
      35             40             45
cac ttc gcc tcc ggg ctg ggc acg gtc gaa ctg acc gtg gcg ctg cac 192
His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His
      50             55             60
tat gtc tac aac acc ccg ttt gac caa ttg att tgg gat gtg ggg cat 240
Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His
      65             70             75             80
cag gct tat ccg cat aaa att ttg acc gga cgc cgc gac aaa atc ggc 288
Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly

```

85	90	95	
acc atc cgt cag aaa ggc ggt ctg cac ccg ttc ccg tgg cgc ggc gaa			336
Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu			
100	105	110	
agc gaa tat gac gta tta agc gtc ggg cat tca tca acc tcc atc agt			384
Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser			
115	120	125	
gcc gga att ggt att gcg gtt gct gcc gaa aaa gaa ggc aaa aat cgc			432
Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg			
130	135	140	
cgc acc gtc tgt gtc att ggc gat ggc gcg att acc gca ggc atg gcg			480
Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala			
145	150	155	160
ttt gaa gcg atg aat cac gcg ggc gat atc cgt cct gat atg ctg gtg			528
Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val			
165	170	175	
att ctc aac gac aat gaa atg tcg att tcc gaa aat gtc ggc gcg ctc			576
Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu			
180	185	190	
aac aac cat ctg gca cag ctg ctt tcc ggt aag ctt tac tct tca ctg			624

Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu	
195	200 205
cgc gaa ggc ggg aaa aaa gtt ttc tct ggc gtg ccg cca att aaa gag	672
Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu	
210	215 220
ctg ctc aaa cgc acc gaa gaa cat att aaa ggc atg gta gtg cct ggc	720
Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly	
225	230 235 240
acg ttg ttt gaa gag ctg ggc ttt aac tac atc ggc ccg gtg gac ggt	768
Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly	
	245 250 255
cac gat gtg ctg ggg ctt atc acc acg cta aag aac atg cgc gac ctg	816
His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu	
	260 265 270
aaa ggc ccg cag ttc ctg cat atc atg acc aaa aaa ggt cgt ggt tat	864
Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr	
	275 280 285
gaa ccg gca gaa aaa gac ccg atc act ttc cac gcc gtg cct aaa ttt	912
Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe	
	290 295 300
gat ccc tcc agc ggt tgt ttg ccg aaa agt agc ggc ggt ttg ccg agc	960

Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser
 305 310 315 320
 tat tca aaa atc ttt ggc gac tgg ttg tgc gaa acg gca gcg aaa gac 1008
 Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp
 325 330 335
 aac aag ctg atg gcg att act ccg gcg atg cgt gaa ggt tcc ggc atg 1056
 Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met
 340 345 350
 gtc gag ttt tca cgt aaa ttc ccg gat cgc tac ttc gac gtg gca att 1104
 Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile
 355 360 365
 gcc gag caa cac gcg gtg acc ttt gct gcg ggt ctg gcg att ggt ggg 1152
 Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly
 370 375 380
 tac aaa ccc att gtc gcg att tac tcc act ttc ctg caa cgc gcc tat 1200
 Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr
 385 390 395 400
 gat cag gtg ctg cat gac gtg gcg att caa aag ctt ccg gtc ctg ttc 1248
 Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe
 405 410 415

gcc atc gac cgc gcg ggc att gtt ggt gct gac ggt caa acc cat cag 1296
 Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln
 420 425 430
 ggt gct ttt gat ctc tct tac ctg cgc tgc ata ccg gaa atg gtc att 1344
 Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile
 435 440 445
 atg acc ccg agc gat gaa aac gaa tgt cgc cag atg ctc tat acc ggc 1392
 Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly
 450 455 460
 tat cac tat aac gat ggc ccg tca gcg gtg cgc tac ccg cgt ggc aac 1440
 Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
 465 470 475 480
 gcg gtc ggc gtg gaa ctg acg ccg ctg gaa aaa cta cca att ggc aaa 1488
 Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys
 485 490 495
 ggc att gtg aag cgt cgt ggc gag aaa ctg gcg atc ctt aac ttt ggt 1536
 Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly
 500 505 510
 acg ctg atg cca gaa gcg gcg aaa gtc gcc gaa tcg ctg aac gcc acg 1584
 Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr
 515 520 525

ctg gtc gat atg cgt ttt gtg aaa ccg ctt gat gaa gcg tta att ctg 1632
 Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu
 530 535 540
 gaa atg gcc gcc agc cat gaa gcg ctg gtc acc gta gaa gaa aac gcc 1680
 Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala
 545 550 555 560
 att atg ggc ggc gca ggc agc ggc gtg aac gaa gtg ctg atg gcc cat 1728
 Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His
 565 570 575
 cgt aaa cca gta ccc gtg ctg aac att ggc ctg ccg gac ttc ttt att 1776
 Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile
 580 585 590
 ccg caa gga act cag gaa gaa atg cgc gcc gaa ctc ggc ctc gat gcc 1824
 Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala
 595 600 605
 gct ggt atg gaa gcc aaa atc aag gcc tgg ctg gca 1860
 Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala
 610 615 620

<210> 7

<211> 897

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(897)

<400> 7

atg gac ttt ccg cag caa ctc gaa gcc tgc gtt aag cag gcc aac cag 48

Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln
1 5 10 15

gcg ctg agc cgt ttt atc gcc cca ctg ccc ttt cag aac act ccc gtg 96

Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val
20 25 30

gtc gaa acc atg cag tat ggc gca tta tta ggt ggt aag cgc ctg cga 144

Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg
35 40 45

cct ttc ctg gtt tat gcc acc ggt cat atg ttc ggc gtt agc aca aac 192

Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn
50 55 60

acg ctg gac gca ccc gct gcc gcc gtt gag tgt atc cac gct tac tca 240

Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Tyr Ser
65 70 75 80

tta att cat gat gat tta ccg gca atg gat gat gac gat ctg cgt cgc 288
 Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg
 85 90 95
 ggt ttg cca acc tgc cat gtg aag ttt ggc gaa gca aac gcg att ctc 336
 Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu
 100 105 110
 gct ggc gac gct tta caa acg ctg gcg ttc tcg att tta agc gat gcc 384
 Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala
 115 120 125
 gat atg ccg gaa gtg tcg gac cgc gac aga att tcg atg att tct gaa 432
 Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu
 130 135 140
 ctg gcg agc gcc agt ggt att gcc gga atg tgc ggt ggt cag gca tta 480
 Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu
 145 150 155 160
 gat tta gac gcg gaa ggc aaa cac gta cct ctg gac gcg ctt gag cgt 528
 Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg
 165 170 175
 att cat cgt cat aaa acc ggc gca ttg att cgc gcc gcc gtt cgc ctt 576
 Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu
 180 185 190

ggt gca tta agc gcc gga gat aaa gga cgt cgt gct ctg ccg gta ctc 624
 Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu
 195 200 205
 gac aag tat gca gag agc atc ggc ctt gcc ttc cag gtt cag gat gac 672
 Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp
 210 215 220
 atc ctg gat gtg gtg gga gat act gca acg ttg gga aaa cgc cag ggt 720
 Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly
 225 230 235 240
 gcc gac cag caa ctt ggt aaa agt acc tac cct gca ctt ctg ggt ctt 768
 Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu
 245 250 255
 gag caa gcc cgg aag aaa gcc cgg gat ctg atc gac gat gcc cgt cag 816
 Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln
 260 265 270
 tcg ctg aaa caa ctg gct gaa cag tca ctc gat acc tcg gca ctg gaa 864
 Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu
 275 280 285
 gcg cta gcg gac tac atc atc cag cgt aat aaa 897
 Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys

290

295

<210> 8

<211> 240

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(240)

<400> 8

atg ccg aag aaa aat gag gcg ccc gcc agc ttt gaa aag gcg ctg agc 48

Met Pro Lys Lys Asn Glu Ala Pro Ala Ser Phe Glu Lys Ala Leu Ser

1

5

10

15

gag ctg gaa cag att gta acc cgt ctg gaa agt ggc gac ctg ccg ctg 96

Glu Leu Glu Gln Ile Val Thr Arg Leu Glu Ser Gly Asp Leu Pro Leu

20

25

30

gaa gag gcg ctg aac gag ttc gaa cgc ggc gtg cag ctg gca cgt cag 144

Glu Glu Ala Leu Asn Glu Phe Glu Arg Gly Val Gln Leu Ala Arg Gln

35

40

45

ggg cag gcc aaa tta caa caa gcc gaa cag cgc gta caa att ctg ctg 192

Gly Gln Ala Lys Leu Gln Gln Ala Glu Gln Arg Val Gln Ile Leu Leu

50

55

60

tct gac aat gaa gac gcc tct cta acc cct ttt aca ccg gac aat gag 240

Ser Asp Asn Glu Asp Ala Ser Leu Thr Pro Phe Thr Pro Asp Asn Glu
65 70 75 80

<210> 9

<211> 1044

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1044)

<400> 9

gtg act ggg gtg aac gaa tgc agc cgc agc aca tgc aac ttg aag tat 48

Val Thr Gly Val Asn Glu Cys Ser Arg Ser Thr Cys Asn Leu Lys Tyr
1 5 10 15

gac gag tat agc agg agt ggc agc atg caa tac aac ccc tta gga aaa 96

Asp Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Met Gln Tyr Asn Pro Leu Gly Lys
20 25 30

acc gac ctt cgc gtt tcc cga ctt tgc ctc ggc tgt atg acc ttt ggc 144

Thr Asp Leu Arg Val Ser Arg Leu Cys Leu Gly Cys Met Thr Phe Gly
35 40 45

gag cca gat cgc ggt aat cac gca tgg aca ctg ccg gaa gaa agc agc 192

Glu Pro Asp Arg Gly Asn His Ala Trp Thr Leu Pro Glu Glu Ser Ser
 50 55 60
 cgt ccc ata att aaa cgt gca ctg gaa ggc ggc ata aat ttc ttt gat 240
 Arg Pro Ile Ile Lys Arg Ala Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Phe Asp
 65 70 75 80
 acc gcc aac agt tat tct gac ggc agc agc gaa gag atc gtc ggt cgc 288
 Thr Ala Asn Ser Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Glu Glu Ile Val Gly Arg
 85 90 95
 gca ctg cgg gat ttc gcc cgt cgt gaa gac gtg gtc gtt gcg acc aaa 336
 Ala Leu Arg Asp Phe Ala Arg Arg Glu Asp Val Val Val Ala Thr Lys
 100 105 110
 gtg ttc cat cgc gtt ggt gat tta ccg gaa gga tta tcc cgt gcg caa 384
 Val Phe His Arg Val Gly Asp Leu Pro Glu Gly Leu Ser Arg Ala Gln
 115 120 125
 att ttg cgc tct atc gac gac agc ctg cga cgt ctc ggc atg gat tat 432
 Ile Leu Arg Ser Ile Asp Asp Ser Leu Arg Arg Leu Gly Met Asp Tyr
 130 135 140
 gtc gat atc ctg caa att cat cgc tgg gat tac aac acg ccg atc gaa 480
 Val Asp Ile Leu Gln Ile His Arg Trp Asp Tyr Asn Thr Pro Ile Glu
 145 150 155 160
 gag acg ctg gaa gcc ctc aac gac gtg gta aaa gcc ggg aaa gcg cgt 528

Glu Thr Leu Glu Ala Leu Asn Asp Val Val Lys Ala Gly Lys Ala Arg
 165 170 175
 tat atc ggc gcg tca tca atg cac gct tcg cag ttt gct cag gca ctg 576
 Tyr Ile Gly Ala Ser Ser Met His Ala Ser Gln Phe Ala Gln Ala Leu
 180 185 190
 gaa ctc caa aaa cag cac ggc tgg gcg cag ttt gtc agt atg cag gat 624
 Glu Leu Gln Lys Gln His Gly Trp Ala Gln Phe Val Ser Met Gln Asp
 195 200 205
 cac tac aat ctg att tat cgt gaa gaa gag cgc gag atg cta cca ctg 672
 His Tyr Asn Leu Ile Tyr Arg Glu Glu Glu Arg Glu Met Leu Pro Leu
 210 215 220
 tgt tat cag gag ggc gtg gcg gta att cca tgg agc ccg ctg gca agg 720
 Cys Tyr Gln Glu Gly Val Ala Val Ile Pro Trp Ser Pro Leu Ala Arg
 225 230 235 240
 ggc cgt ctg acg cgt ccg tgg gga gaa act acc gca cga ctg gtg tct 768
 Gly Arg Leu Thr Arg Pro Trp Gly Glu Thr Thr Ala Arg Leu Val Ser
 245 250 255
 gat gag gtg ggg aaa aat ctc tat aaa gaa agc gat gaa aat gac gcg 816
 Asp Glu Val Gly Lys Asn Leu Tyr Lys Glu Ser Asp Glu Asn Asp Ala
 260 265 270

cag atc gca gag cgg tta aca ggc gtc agt gaa gaa ctg ggg gcg aca 864
 Gln Ile Ala Glu Arg Leu Thr Gly Val Ser Glu Glu Leu Gly Ala Thr
 275 280 285
 cga gca caa gtt gcg ctg gcc tgg ttg ttg agt aaa ccg ggc att gcc 912
 Arg Ala Gln Val Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ser Lys Pro Gly Ile Ala
 290 295 300
 gca ccg att atc gga act tcg cgc gaa gaa cag ctt gat gag cta ttg 960
 Ala Pro Ile Ile Gly Thr Ser Arg Glu Glu Gln Leu Asp Glu Leu Leu
 305 310 315 320
 aac gcg gtg gat atc act ttg aag ccg gaa cag att gcc gaa ctg gaa 1008
 Asn Ala Val Asp Ile Thr Leu Lys Pro Glu Gln Ile Ala Glu Leu Glu
 325 330 335
 acg ccg tat aaa ccg cat cct gtc gta gga ttt aaa 1044
 Thr Pro Tyr Lys Pro His Pro Val Val Gly Phe Lys
 340 345

<210> 10

<211> 1194

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1194)

<400> 10

```

atg aag caa ctc acc att ctg ggc tcg acc ggc tcg att ggt tgc agc   48
Met Lys Gln Leu Thr Ile Leu Gly Ser Thr Gly Ser Ile Gly Cys Ser
  1             5             10             15
acg ctg gac gtg gtg cgc cat aat ccc gaa cac ttc cgc gta gtt gcg   96
Thr Leu Asp Val Val Arg His Asn Pro Glu His Phe Arg Val Val Ala
      20             25             30
ctg gtg gca ggc aaa aat gtc act cgc atg gta gaa cag tgc ctg gaa  144
Leu Val Ala Gly Lys Asn Val Thr Arg Met Val Glu Gln Cys Leu Glu
      35             40             45
ttc tct ccc cgc tat gcc gta atg gac gat gaa gcg agt gcg aaa ctt  192
Phe Ser Pro Arg Tyr Ala Val Met Asp Asp Glu Ala Ser Ala Lys Leu
      50             55             60
ctt aaa acg atg cta cag caa cag ggt agc cgc acc gaa gtc tta agt  240
Leu Lys Thr Met Leu Gln Gln Gln Gly Ser Arg Thr Glu Val Leu Ser
      65             70             75             80
ggg caa caa gcc gct tgc gat atg gca gcg ctt gag gat gtt gat cag  288
Gly Gln Gln Ala Ala Cys Asp Met Ala Ala Leu Glu Asp Val Asp Gln
      85             90             95
gtg atg gca gcc att gtt ggc gct gct ggg ctg tta cct acg ctt gct  336

```

Val Met Ala Ala Ile Val Gly Ala Ala Gly Leu Leu Pro Thr Leu Ala
 100 105 110
 gcg atc cgc gcg ggt aaa acc att ttg ctg gcc aat aaa gaa tca ctg 384
 Ala Ile Arg Ala Gly Lys Thr Ile Leu Leu Ala Asn Lys Glu Ser Leu
 115 120 125
 gtt acc tgc gga cgt ctg ttt atg gac gcc gta aag cag agc aaa gcg 432
 Val Thr Cys Gly Arg Leu Phe Met Asp Ala Val Lys Gln Ser Lys Ala
 130 135 140
 caa ttg tta ccg gtc gat agc gaa cat aac gcc att ttt cag agt tta 480
 Gln Leu Leu Pro Val Asp Ser Glu His Asn Ala Ile Phe Gln Ser Leu
 145 150 155 160
 ccg caa cct atc cag cat aat ctg gga tac gct gac ctt gag caa aat 528
 Pro Gln Pro Ile Gln His Asn Leu Gly Tyr Ala Asp Leu Glu Gln Asn
 165 170 175
 ggc gtg gtg tcc att tta ctt acc ggg tct ggt ggc cct ttc cgt gag 576
 Gly Val Val Ser Ile Leu Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Phe Arg Glu
 180 185 190
 acg cca ttg cgc gat ttg gca aca atg acg ccg gat caa gcc tgc cgt 624
 Thr Pro Leu Arg Asp Leu Ala Thr Met Thr Pro Asp Gln Ala Cys Arg
 195 200 205

cat ccg aac tgg tcg atg ggg cgt aaa att tct gtc gat tcg gct acc 672
 His Pro Asn Trp Ser Met Gly Arg Lys Ile Ser Val Asp Ser Ala Thr
 210 215 220

atg atg aac aaa ggt ctg gaa tac att gaa gcg cgt tgg ctg ttt aac 720
 Met Met Asn Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Glu Ala Arg Trp Leu Phe Asn
 225 230 235 240

gcc agc gcc agc cag atg gaa gtg ctg att cac ccg cag tca gtg att 768
 Ala Ser Ala Ser Gln Met Glu Val Leu Ile His Pro Gln Ser Val Ile
 245 250 255

cac tca atg gtg cgc tat cag gac ggc agt gtt ctg gcg cag ctg ggg 816
 His Ser Met Val Arg Tyr Gln Asp Gly Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly
 260 265 270

gaa ccg gat atg gta cgc caa ttg ccc aca cca tgg gca tgg ccg aat 864
 Glu Pro Asp Met Val Arg Gln Leu Pro Thr Pro Trp Ala Trp Pro Asn
 275 280 285

cgc gtg aac tct ggc gtg aag ccg ctc gat ttt tgc aaa cta agt gcg 912
 Arg Val Asn Ser Gly Val Lys Pro Leu Asp Phe Cys Lys Leu Ser Ala
 290 295 300

ttg aca ttt gcc gca ccg gat tat gat cgt tat cca tgc ctg aaa ctg 960
 Leu Thr Phe Ala Ala Pro Asp Tyr Asp Arg Tyr Pro Cys Leu Lys Leu
 305 310 315 320

gcg atg gag gcg ttc gaa caa ggc cag gca gcg acg aca gca ttg aat 1008
 Ala Met Glu Ala Phe Glu Gln Gly Gln Ala Ala Thr Thr Ala Leu Asn
 325 330 335
 gcc gca aac gaa atc acc gtt gct gct ttt ctt gcg caa caa atc cgc 1056
 Ala Ala Asn Glu Ile Thr Val Ala Ala Phe Leu Ala Gln Gln Ile Arg
 340 345 350
 ttt acg gat atc gct gcg ttg aat tta tcc gta ctg gaa aaa atg gat 1104
 Phe Thr Asp Ile Ala Ala Leu Asn Leu Ser Val Leu Glu Lys Met Asp
 355 360 365
 atg cgc gaa cca caa tgt gtg gac gat gtg tta tct gtt gat gcg aac 1152
 Met Arg Glu Pro Gln Cys Val Asp Asp Val Leu Ser Val Asp Ala Asn
 370 375 380
 gcg cgt gaa gtc gcc aga aaa gag gtg atg cgt ctc gca agc 1194
 Ala Arg Glu Val Ala Arg Lys Glu Val Met Arg Leu Ala Ser
 385 390 395

<210> 11

<211> 4390

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (208)..(447)

<220>

<221> CDS

<222> (450)..(1346)

<220>

<221> CDS

<222> (1374)..(3233)

<220>

<221> CDS

<222> (3344)..(4390)

<400> 11

atggcggcaa tggttcgttg gcaagcctta agcgacttgt atagggaaaa atacagcagc 60

ccacacctgc ggctgcatcc aggcgcggaa gtataccact aacatcgctt tgctgtgcac 120

atcaccttac cattgcgcgt tatttgetat ttgccctgag tccgttacca tgacggggcg 180

aaaaatattg agagtcagac attcatt atg ccg aag aaa aat gag gcg ccc gcc 234

Met Pro Lys Lys Asn Glu Ala Pro Ala

1

5

agc ttt gaa aag gcg ctg agc gag ctg gaa cag att gta acc cgt ctg 282

Ser Phe Glu Lys Ala Leu Ser Glu Leu Glu Gln Ile Val Thr Arg Leu

10

15

20

25

gaa agt ggc gac ctg ccg ctg gaa gag gcg ctg aac gag ttc gaa cgc 330
 Glu Ser Gly Asp Leu Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Glu Phe Glu Arg
 30 35 40
 ggc gtg cag ctg gca cgt cag ggg cag gcc aaa tta caa caa gcc gaa 378
 Gly Val Gln Leu Ala Arg Gln Gly Gln Ala Lys Leu Gln Gln Ala Glu
 45 50 55
 cag cgc gta caa att ctg ctg tct gac aat gaa gac gcc tct cta acc 426
 Gln Arg Val Gln Ile Leu Leu Ser Asp Asn Glu Asp Ala Ser Leu Thr
 60 65 70
 cct ttt aca ccg gac aat gag ta atg gac ttt ccg cag caa ctc gaa 473
 Pro Phe Thr Pro Asp Asn Glu Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu
 75 80 1 5
 gcc tgc gtt aag cag gcc aac cag gcg ctg agc cgt ttt atc gcc cca 521
 Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro
 10 15 20
 ctg ccc ttt cag aac act ccc gtg gtc gaa acc atg cag tat ggc gca 569
 Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala
 25 30 35 40
 tta tta ggt ggt aag cgc ctg cga cct ttc ctg gtt tat gcc acc ggt 617
 Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly
 45 50 55

cat atg ttc ggc gtt agc aca aac acg ctg gac gca ccc gct gcc gcc 665
His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala
60 65 70
gtt gag tgt atc cac gct tac tca tta att cat gat gat tta ccg gca 713
Val Glu Cys Ile His Ala Tyr Ser Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala
75 80 85
atg gat gat gac gat ctg cgt cgc ggt ttg cca acc tgc cat gtg aag 761
Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys
90 95 100
ttt ggc gaa gca aac gcg att ctc gct ggc gac gct tta caa acg ctg 809
Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu
105 110 115 120
gcg ttc tcg att tta agc gat gcc gat atg ccg gaa gtg tcg gac cgc 857
Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg
125 130 135
gac aga att tcg atg att tct gaa ctg gcg agc gcc agt ggt att gcc 905
Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala
140 145 150
gga atg tgc ggt ggt cag gca tta gat tta gac gcg gaa ggc aaa cac 953
Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His

155	160	165	
gta cct ctg gac gcg ctt gag cgt att cat cgt cat aaa acc ggc gca			1001
Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala			
170	175	180	
ttg att cgc gcc gcc gtt cgc ctt ggt gca tta agc gcc gga gat aaa			1049
Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys			
185	190	195	200
gga cgt cgt gct ctg ccg gta ctc gac aag tat gca gag agc atc ggc			1097
Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly			
	205	210	215
ctt gcc ttc cag gtt cag gat gac atc ctg gat gtg gtg gga gat act			1145
Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr			
	220	225	230
gca acg ttg gga aaa cgc cag ggt gcc gac cag caa ctt ggt aaa agt			1193
Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser			
	235	240	245
acc tac cct gca ctt ctg ggt ctt gag caa gcc cgg aag aaa gcc cgg			1241
Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg			
	250	255	260
gat ctg atc gac gat gcc cgt cag tcg ctg aaa caa ctg gct gaa cag			1289

35/75

Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His Gln Ala Tyr Pro His Lys
 75 80 85
 att ttg acc gga cgc cgc gac aaa atc ggc acc atc cgt cag aaa ggc 1679
 Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly Thr Ile Arg Gln Lys Gly
 90 95 100
 ggt ctg cac ccg ttc ccg tgg cgc ggc gaa agc gaa tat gac gta tta 1727
 Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu Ser Glu Tyr Asp Val Leu
 105 110 115
 agc gtc ggg cat tca tca acc tcc atc agt gcc gga att ggt att gcg 1775
 Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser Ala Gly Ile Gly Ile Ala
 120 125 130
 gtt gct gcc gaa aaa gaa ggc aaa aat cgc cgc acc gtc tgt gtc att 1823
 Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg Arg Thr Val Cys Val Ile
 135 140 145 150
 ggc gat ggc gcg att acc gca ggc atg gcg ttt gaa gcg atg aat cac 1871
 Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala Phe Glu Ala Met Asn His
 155 160 165
 gcg ggc gat atc cgt cct gat atg ctg gtg att ctc aac gac aat gaa 1919
 Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val Ile Leu Asn Asp Asn Glu
 170 175 180

atg tcg att tcc gaa aat gtc ggc gcg ctc aac aac cat ctg gca cag 1967
 Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu Asn Asn His Leu Ala Gln
 185 190 195
 ctg ctt tcc ggt aag ctt tac tct tca ctg cgc gaa ggc ggg aaa aaa 2015
 Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu Arg Glu Gly Gly Lys Lys
 200 205 210
 gtt ttc tct ggc gtg ccg cca att aaa gag ctg ctc aaa cgc acc gaa 2063
 Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu Leu Leu Lys Arg Thr Glu
 215 220 225 230
 gaa cat att aaa ggc atg gta gtg cct ggc acg ttg ttt gaa gag ctg 2111
 Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly Thr Leu Phe Glu Glu Leu
 235 240 245
 ggc ttt aac tac atc ggc ccg gtg gac ggt cac gat gtg ctg ggg ctt 2159
 Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asp Val Leu Gly Leu
 250 255 260
 atc acc acg cta aag aac atg cgc gac ctg aaa ggc ccg cag ttc ctg 2207
 Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu Lys Gly Pro Gln Phe Leu
 265 270 275
 cat atc atg acc aaa aaa ggt cgt ggt tat gaa ccg gca gaa aaa gac 2255
 His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr Glu Pro Ala Glu Lys Asp
 280 285 290

ccg atc act ttc cac gcc gtg cct aaa ttt gat ccc tcc agc ggt tgt 2303
 Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe Asp Pro Ser Ser Gly Cys
 295 300 305 310
 ttg ccg aaa agt agc ggc ggt ttg ccg agc tat tca aaa atc ttt ggc 2351
 Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser Tyr Ser Lys Ile Phe Gly
 315 320 325
 gac tgg ttg tgc gaa acg gca gcg aaa gac aac aag ctg atg gcg att 2399
 Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp Asn Lys Leu Met Ala Ile
 330 335 340
 act ccg gcg atg cgt gaa ggt tcc ggc atg gtc gag ttt tca cgt aaa 2447
 Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met Val Glu Phe Ser Arg Lys
 345 350 355
 ttc ccg gat cgc tac ttc gac gtg gca att gcc gag caa cac gcg gtg 2495
 Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile Ala Glu Gln His Ala Val
 360 365 370
 acc ttt gct gcg ggt ctg gcg att ggt ggg tac aaa ccc att gtc gcg 2543
 Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly Tyr Lys Pro Ile Val Ala
 375 380 385 390
 att tac tcc act ttc ctg caa cgc gcc tat gat cag gtg ctg cat gac 2591
 Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr Asp Gln Val Leu His Asp

	395	400	405	
gtg gcg att caa aag ctt ccg gtc ctg ttc gcc atc gac cgc gcg ggc				2639
Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe Ala Ile Asp Arg Ala Gly				
	410	415	420	
att gtt ggt gct gac ggt caa acc cat cag ggt gct ttt gat ctc tct				2687
Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln Gly Ala Phe Asp Leu Ser				
	425	430	435	
tac ctg cgc tgc ata ccg gaa atg gtc att atg acc ccg agc gat gaa				2735
Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile Met Thr Pro Ser Asp Glu				
	440	445	450	
aac gaa tgt cgc cag atg ctc tat acc ggc tat cac tat aac gat ggc				2783
Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly Tyr His Tyr Asn Asp Gly				
	455	460	465	470
ccg tca gcg gtg cgc tac ccg cgt ggc aac gcg gtc ggc gtg gaa ctg				2831
Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn Ala Val Gly Val Glu Leu				
	475	480	485	
acg ccg ctg gaa aaa cta cca att ggc aaa ggc att gtg aag cgt cgt				2879
Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys Gly Ile Val Lys Arg Arg				
	490	495	500	
ggc gag aaa ctg gcg atc ctt aac ttt ggt acg ctg atg cca gaa gcg				2927

Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly Thr Leu Met Pro Glu Ala
 505 510 515
 gcg aaa gtc gcc gaa tcg ctg aac gcc acg ctg gtc gat atg cgt ttt 2975
 Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr Leu Val Asp Met Arg Phe
 520 525 530
 gtg aaa ccg ctt gat gaa gcg tta att ctg gaa atg gcc gcc agc cat 3023
 Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu Glu Met Ala Ala Ser His
 535 540 545 550
 gaa gcg ctg gtc acc gta gaa gaa aac gcc att atg ggc ggc gca ggc 3071
 Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala Ile Met Gly Gly Ala Gly
 555 560 565
 agc ggc gtg aac gaa gtg ctg atg gcc cat cgt aaa cca gta ccc gtg 3119
 Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His Arg Lys Pro Val Pro Val
 570 575 580
 ctg aac att ggc ctg ccg gac ttc ttt att ccg caa gga act cag gaa 3167
 Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile Pro Gln Gly Thr Gln Glu
 585 590 595
 gaa atg cgc gcc gaa ctc ggc ctc gat gcc gct ggt atg gaa gcc aaa 3215
 Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala Ala Gly Met Glu Ala Lys
 600 605 610
 atc aag gcc tgg ctg gca taatccctac tccactcctg ctatgcttaa 3263

Ile Lys Ala Trp Leu Ala

615

620

gaaattattc atagactcta aataattcga gttagcaggaa ggcggcaaac gagtgaagcc 3323

ccaggagctt acataagtaa gtg act ggg gtg aac gaa tgc agc cgc agc aca 3376

Val Thr Gly Val Asn Glu Cys Ser Arg Ser Thr

1

5

10

tgc aac ttg aag tat gac gag tat agc agg agt ggc agc atg caa tac 3424

Cys Asn Leu Lys Tyr Asp Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Met Gln Tyr

15

20

25

aac ccc tta gga aaa acc gac ctt cgc gtt tcc cga ctt tgc ctc ggc 3472

Asn Pro Leu Gly Lys Thr Asp Leu Arg Val Ser Arg Leu Cys Leu Gly

30

35

40

tgt atg acc ttt ggc gag cca gat cgc ggt aat cac gca tgg aca ctg 3520

Cys Met Thr Phe Gly Glu Pro Asp Arg Gly Asn His Ala Trp Thr Leu

45

50

55

ccg gaa gaa agc agc cgt ccc ata att aaa cgt gca ctg gaa ggc ggc 3568

Pro Glu Glu Ser Ser Arg Pro Ile Ile Lys Arg Ala Leu Glu Gly Gly

60

65

70

75

ata aat ttc ttt gat acc gcc aac agt tat tct gac ggc agc agc gaa 3616

Ile Asn Phe Phe Asp Thr Ala Asn Ser Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Glu

80	85	90	
gag atc gtc ggt cgc gca ctg cgg gat ttc gcc cgt cgt gaa gac gtg			3664
Glu Ile Val Gly Arg Ala Leu Arg Asp Phe Ala Arg Arg Glu Asp Val			
95	100	105	
gtc gtt gcg acc aaa gtg ttc cat cgc gtt ggt gat tta ccg gaa gga			3712
Val Val Ala Thr Lys Val Phe His Arg Val Gly Asp Leu Pro Glu Gly			
110	115	120	
tta tcc cgt gcg caa att ttg cgc tct atc gac gac agc ctg cga cgt			3760
Leu Ser Arg Ala Gln Ile Leu Arg Ser Ile Asp Asp Ser Leu Arg Arg			
125	130	135	
ctc ggc atg gat tat gtc gat atc ctg caa att cat cgc tgg gat tac			3808
Leu Gly Met Asp Tyr Val Asp Ile Leu Gln Ile His Arg Trp Asp Tyr			
140	145	150	155
aac acg ccg atc gaa gag acg ctg gaa gcc ctc aac gac gtg gta aaa			3856
Asn Thr Pro Ile Glu Glu Thr Leu Glu Ala Leu Asn Asp Val Val Lys			
160	165	170	
gcc ggg aaa gcg cgt tat atc ggc gcg tca tca atg cac gct tcg cag			3904
Ala Gly Lys Ala Arg Tyr Ile Gly Ala Ser Ser Met His Ala Ser Gln			
175	180	185	
ttt gct cag gca ctg gaa ctc caa aaa cag cac ggc tgg gcg cag ttt			3952
Phe Ala Gln Ala Leu Glu Leu Gln Lys Gln His Gly Trp Ala Gln Phe			

190	195	200	
gtc agt atg cag gat cac tac aat ctg att tat cgt gaa gaa gag cgc			4000
Val Ser Met Gln Asp His Tyr Asn Leu Ile Tyr Arg Glu Glu Glu Arg			
205	210	215	
gag atg cta cca ctg tgt tat cag gag ggc gtg gcg gta att cca tgg			4048
Glu Met Leu Pro Leu Cys Tyr Gln Glu Gly Val Ala Val Ile Pro Trp			
220	225	230	235
agc ccg ctg gca agg ggc cgt ctg acg cgt ccg tgg gga gaa act acc			4096
Ser Pro Leu Ala Arg Gly Arg Leu Thr Arg Pro Trp Gly Glu Thr Thr			
240	245	250	
gca cga ctg gtg tct gat gag gtg ggg aaa aat ctc tat aaa gaa agc			4144
Ala Arg Leu Val Ser Asp Glu Val Gly Lys Asn Leu Tyr Lys Glu Ser			
255	260	265	
gat gaa aat gac gcg cag atc gca gag cgg tta aca ggc gtc agt gaa			4192
Asp Glu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Glu Arg Leu Thr Gly Val Ser Glu			
270	275	280	
gaa ctg ggg gcg aca cga gca caa gtt gcg ctg gcc tgg ttg ttg agt			4240
Glu Leu Gly Ala Thr Arg Ala Gln Val Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ser			
285	290	295	
aaa ccg ggc att gcc gca ccg att atc gga act tcg cgc gaa gaa cag			4288

Lys

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 13

ccgaattctt atttaaattcc tacgacagga tgcg

34

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 14

ccggatccat gagttttgat attgccaaat acc

33

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 15

ccgaattctt atgccagcca ggccttgatt ttg

33

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 16

ccgaattctt actcattgtc cgggtgtaaaa ggg

33

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 17

ccggatccat ggactttccg cagcaactcg aag

33

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 18

ccgaattctt atttattacg ctggatgatg tag

33

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 19

ccggatccta atccctactc cactcctgct atg

33

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 20

gggggatcca agcaactcac cattctgggc

30

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 21

gggggatccg cttgcgagac gcatcacctc

30

<210> 22

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 22

gggggatcca gttttgatat tgccaaatac cc

32

<210> 23

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 23

gggggatcct gccagccagg ccttgatttt gg

32

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 24

gggggatccg agcaactcac cattctgggc

30

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 25

gggggatccg cttgcgagac gcatcacctc

30

<210> 26

<211> 637

<212> PRT

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 26

Met Thr Asp Arg Pro Cys Thr Pro Thr Leu Asp Arg Val Thr Leu Pro
 1 5 10 15

Val Asp Met Lys Gly Leu Thr Asp Arg Glu Leu Arg Ser Leu Ala Asp
 20 25 30

Glu Leu Arg Ala Glu Thr Ile Ser Ala Val Ser Val Thr Gly Gly His
 35 40 45

Leu Gly Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His Ala
 50 55 60

Val Phe Asp Ala Pro Arg Asp Lys Ile Ile Trp Asp Val Gly His Gln
 65 70 75 80

Cys Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Arg Ile Arg Thr
 85 90 95

Leu Arg Gln Gly Gly Gly Leu Ser Gly Phe Thr Lys Arg Ser Glu Ser
 100 105 110

Pro Tyr Asp Cys Phe Gly Ala Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser Ala
 115 120 125

Ala Val Gly Phe Ala Ala Ala Arg Glu Met Gly Gly Asp Thr Gly Asp
 130 135 140

Ala Val Ala Val Ile Gly Asp Gly Ser Met Ser Ala Gly Met Ala Phe
 145 150 155 160

Glu Ala Leu Asn His Gly Gly His Leu Lys Asn Arg Val Ile Val Ile
165 170 175

Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ala Pro Pro Val Gly Ala Leu Ser
180 185 190

Ser Tyr Leu Ser Arg Leu Tyr Ala Gly Ala Pro Phe Gln Asp Phe Lys
195 200 205

Ala Ala Ala Lys Gly Ala Leu Gly Leu Leu Pro Glu Pro Phe Gln Glu
210 215 220

Gly Ala Arg Arg Ala Lys Glu Met Leu Lys Ser Val Thr Val Gly Gly
225 230 235 240

Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Ser Tyr Val Gly Pro Ile Asp Gly
245 250 255

His Asp Leu Asp Gln Leu Leu Pro Val Leu Arg Thr Val Lys Gln Arg
260 265 270

Ala His Ala Pro Val Leu Ile His Val Ile Thr Lys Lys Gly Arg Gly
275 280 285

Tyr Ala Pro Ala Glu Ala Ala Arg Asp Arg Gly His Ala Thr Asn Lys
290 295 300

Phe Asn Val Leu Thr Gly Ala Gln Val Lys Pro Val Ser Asn Ala Pro
305 310 315 320

Ser Tyr Thr Lys Val Phe Ala Gln Ser Leu Ile Lys Glu Ala Glu Val
325 330 335

Asp Glu Arg Ile Cys Ala Val Thr Ala Ala Met Pro Asp Gly Thr Gly
340 345 350

Leu Asn Leu Phe Gly Glu Arg Phe Pro Lys Arg Thr Phe Asp Val Gly
355 360 365

Ile Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ser Ala Ala Leu Ala Ala Gly
370 375 380

Gly Met Arg Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Gly
385 390 395 400

Tyr Asp Gln Ile Val His Asp Val Ala Ile Gln Arg Leu Pro Val Arg
405 410 415

Phe Ala Ile Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Ala Thr His
420 425 430

Ala Gly Ser Phe Asp Val Ala Phe Leu Ser Asn Leu Pro Gly Ile Val
435 440 445

Val Met Ala Ala Ala Asp Glu Ala Glu Leu Val His Met Val Ala Thr
450 455 460

Ala Ala Ala His Asp Glu Gly Pro Ile Ala Phe Arg Tyr Pro Arg Gly
465 470 475 480

Asp Gly Val Gly Val Glu Met Pro Val Lys Gly Val Pro Leu Gln Ile
485 490 495

Gly Arg Gly Arg Val Val Arg Glu Gly Thr Arg Ile Ala Leu Leu Ser
500 505 510

Phe Gly Thr Arg Leu Ala Glu Val Gln Val Ala Ala Glu Ala Leu Arg
 515 520 525

Ala Arg Gly Ile Ser Pro Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Ala Lys Pro
 530 535 540

Leu Asp Arg Asp Leu Ile Leu Gln Leu Ala Ala His His Glu Ala Leu
 545 550 555 560

Ile Thr Ile Glu Glu Gly Ala Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val Ala
 565 570 575

Gln Leu Leu Ala Glu Ala Gly Val Phe Asp Arg Gly Phe Arg Tyr Arg
 580 585 590

Ser Met Val Leu Pro Asp Thr Phe Ile Asp His Asn Ser Ala Glu Val
 595 600 605

Met Tyr Ala Thr Ala Gly Leu Asn Ala Ala Asp Ile Glu Arg Lys Ala
 610 615 620

Leu Glu Thr Leu Gly Val Glu Val Leu Ala Arg Arg Ala
 625 630 635

<210> 27

<211> 1911

<212> DNA

<213> Rhodobacter sphaeroides

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1911)

<400> 27

atg acc gac aga ccc tgc acg ccg acg ctc gac cgg gtg acg ctc ccg 48

Met Thr Asp Arg Pro Cys Thr Pro Thr Leu Asp Arg Val Thr Leu Pro

1 5 10 15

gtg gac atg aag ggc ctc acg gac cgt gag ctg cgc tcg ctg gcc gac 96

Val Asp Met Lys Gly Leu Thr Asp Arg Glu Leu Arg Ser Leu Ala Asp

20 25 30

gag ctg cgg gcc gaa acg atc tcg gcc gtg tcg gtg acg ggc ggg cat 144

Glu Leu Arg Ala Glu Thr Ile Ser Ala Val Ser Val Thr Gly Gly His

35 40 45

ctg ggc gca ggc ctc ggc gtg gtg gag ttg acg gtt gcg ctg cat gcg 192

Leu Gly Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His Ala

50 55 60

gtc ttc gat gcg ccg cgc gac aag atc atc tgg gac gtg ggc cac cag 240

Val Phe Asp Ala Pro Arg Asp Lys Ile Ile Trp Asp Val Gly His Gln

65 70 75 80

tgc tac ccc cac aag atc ctg acc ggg cgg cgc gac cgc atc cgc aca 288

Cys Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Arg Ile Arg Thr

85 90 95

ctg cgg cag ggc ggg ggt ctc tcg ggc ttc acc aag cgc tcc gag agc 336

Leu Arg Gln Gly Gly Gly Leu Ser Gly Phe Thr Lys Arg Ser Glu Ser

100 105 110

ccc tac gac tgt ttc ggc gcg ggc cat tcc tcg acc tcg atc tcg gcc 384

Pro Tyr Asp Cys Phe Gly Ala Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser Ala

115	120	125	
gcg gtg ggc ttt gcc gcg gcg cgc gag atg ggc ggc gac acg ggc gac			432
Ala Val Gly Phe Ala Ala Ala Arg Glu Met Gly Gly Asp Thr Gly Asp			
130	135	140	
gcg gtg gcg gtg atc ggc gat ggc tcg atg tcg gcc ggc atg gcc ttc			480
Ala Val Ala Val Ile Gly Asp Gly Ser Met Ser Ala Gly Met Ala Phe			
145	150	155	160
gag gcg ctg aac cac ggc ggg cac ctg aag aac cgg gtg atc gtg atc			528
Glu Ala Leu Asn His Gly Gly His Leu Lys Asn Arg Val Ile Val Ile			
165	170	175	
ctg aac gac aat gag atg agc atc gcg ccg ccg gtg ggg gcg ctg tcg			576
Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ala Pro Pro Val Gly Ala Leu Ser			
180	185	190	
tcc tat ctc tcg cgg ctc tat gcg ggc gcg ccg ttc cag gac ttc aag			624
Ser Tyr Leu Ser Arg Leu Tyr Ala Gly Ala Pro Phe Gln Asp Phe Lys			
195	200	205	
gcg gcc gcc aag gga gcg ctc ggg ctt ctg ccc gaa ccg ttc cag gag			672
Ala Ala Ala Lys Gly Ala Leu Gly Leu Leu Pro Glu Pro Phe Gln Glu			
210	215	220	
ggc gcg cgc cgc gcc aag gag atg ctg aag agc gtc acc gtc ggc ggc			720
Gly Ala Arg Arg Ala Lys Glu Met Leu Lys Ser Val Thr Val Gly Gly			
225	230	235	240
acg ctc ttc gag gag ctg ggt ttc tcc tat gtc ggc ccg atc gac ggg			768
Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Ser Tyr Val Gly Pro Ile Asp Gly			

245	250	255	
cac gat ctc gac cag ctt ctg ccg gtg ctg cgg acc gtc aag cag cgg			816
His Asp Leu Asp Gln Leu Leu Pro Val Leu Arg Thr Val Lys Gln Arg			
260	265	270	
gcg cat gcg ccg gtg ctg atc cat gtc atc acc aag aag ggc agg ggc			864
Ala His Ala Pro Val Leu Ile His Val Ile Thr Lys Lys Gly Arg Gly			
275	280	285	
tat gct ccg gcc gag gcc gcg cgc gac cgc ggc cat gcc acg aac aag			912
Tyr Ala Pro Ala Glu Ala Ala Arg Asp Arg Gly His Ala Thr Asn Lys			
290	295	300	
ttc aac gtc ctg acc ggc gcg cag gtg aag ccg gtc tcg aac gcc ccc			960
Phe Asn Val Leu Thr Gly Ala Gln Val Lys Pro Val Ser Asn Ala Pro			
305	310	315	320
tcc tac acc aag gtc ttc gcc cag agc ctc atc aag gag gcc gag gtc			1008
Ser Tyr Thr Lys Val Phe Ala Gln Ser Leu Ile Lys Glu Ala Glu Val			
325	330	335	
gac gag cgg atc tgc gcg gtg acg gcc gcc atg ccg gac ggg acg ggg			1056
Asp Glu Arg Ile Cys Ala Val Thr Ala Ala Met Pro Asp Gly Thr Gly			
340	345	350	
ctc aac ctc ttc ggc gag cgg ttt ccg aag cgc acc ttc gac gtg ggc			1104
Leu Asn Leu Phe Gly Glu Arg Phe Pro Lys Arg Thr Phe Asp Val Gly			
355	360	365	
atc gcg gaa cag cat gcg gtg acc ttc tcg gcg gcg ctt gcg gca ggc			1152
Ile Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ser Ala Ala Leu Ala Ala Gly			

370	375	380	
ggc atg cgg ccc ttc tgc gcg atc tat tcc acc ttc ctc cag cgc ggc			1200
Gly Met Arg Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Gly			
385	390	395	400
tac gac cag atc gtg cat gac gtg gcg atc cag cgc ctg ccg gtg cgc			1248
Tyr Asp Gln Ile Val His Asp Val Ala Ile Gln Arg Leu Pro Val Arg			
405	410	415	
ttc gcc atc gat cgc gcg ggc ctc gtg ggg gcg gac ggc gcc acc cat			1296
Phe Ala Ile Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Ala Thr His			
420	425	430	
gcg ggc tcg ttc gac gtg gcc ttc ctg tcg aac ctg ccc ggc atc gtg			1344
Ala Gly Ser Phe Asp Val Ala Phe Leu Ser Asn Leu Pro Gly Ile Val			
435	440	445	
gtg atg gcc gcc gcc gac gag gcc gag ctc gtc cat atg gtg gcc acc			1392
Val Met Ala Ala Ala Asp Glu Ala Glu Leu Val His Met Val Ala Thr			
450	455	460	
gcc gcc gcc cat gac gaa ggg ccc atc gcc ttc cgc tac ccg cgc ggc			1440
Ala Ala Ala His Asp Glu Gly Pro Ile Ala Phe Arg Tyr Pro Arg Gly			
465	470	475	480
gac ggc gtg ggg gtc gag atg ccg gtg aag ggc gtg ccg ctc cag atc			1488
Asp Gly Val Gly Val Glu Met Pro Val Lys Gly Val Pro Leu Gln Ile			
485	490	495	
ggc cgc ggc cgt gtg gtg cgc gag ggc acg cga atc gcg ctt ttg tcc			1536
Gly Arg Gly Arg Val Val Arg Glu Gly Thr Arg Ile Ala Leu Leu Ser			

500	505	510	
ttc ggc acc cgt ctg gcc gag gtg cag gtg gcc gcc gag gcg ctg cgt			1584
Phe Gly Thr Arg Leu Ala Glu Val Gln Val Ala Ala Glu Ala Leu Arg			
515	520	525	
gcg cgc ggg atc tct ccc acg gtt gcg gat gcg cgc ttt gca aag ccg			1632
Ala Arg Gly Ile Ser Pro Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Ala Lys Pro			
530	535	540	
ctc gac cgg gat ctg atc ctg cag ctc gcg gcc cat cac gag gcg ctt			1680
Leu Asp Arg Asp Leu Ile Leu Gln Leu Ala Ala His His Glu Ala Leu			
545	550	555	560
atc acc atc gag gag ggc gcc atc ggc ggt ttc ggc agc cat gtg gcg			1728
Ile Thr Ile Glu Glu Gly Ala Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val Ala			
565	570	575	
cag ctt ctg gcc gag gcc ggg gtc ttc gac cgc ggc ttc cgg tat cgc			1776
Gln Leu Leu Ala Glu Ala Gly Val Phe Asp Arg Gly Phe Arg Tyr Arg			
580	585	590	
tcg atg gtg ctg ccc gac acg ttc atc gac cac aac agc gcg gag gtg			1824
Ser Met Val Leu Pro Asp Thr Phe Ile Asp His Asn Ser Ala Glu Val			
595	600	605	
atg tat gcc acc gcc ggg ctg aat gcg gcc gac ata gag cgg aag gcg			1872
Met Tyr Ala Thr Ala Gly Leu Asn Ala Ala Asp Ile Glu Arg Lys Ala			
610	615	620	
ctg gag acg ctg ggg gtg gag gtc ctc gcc cgc cgc gcc			1911
Leu Glu Thr Leu Gly Val Glu Val Leu Ala Arg Arg Ala			

625

630

635

<210> 28

<211> 648

<212> PRT

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 28

Met Thr Asn Pro Thr Pro Arg Pro Glu Thr Pro Leu Leu Asp Arg Val

1

5

10

15

Cys Cys Pro Ala Asp Met Lys Ala Leu Ser Asp Ala Glu Leu Glu Arg

20

25

30

Leu Ala Asp Glu Val Arg Ser Glu Val Ile Ser Val Val Ala Glu Thr

35

40

45

Gly Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala

50

55

60

Leu His Ala Val Phe Asn Thr Pro Thr Asp Lys Leu Val Trp Asp Val

65

70

75

80

Gly His Gln Cys Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Glu Gln

85

90

95

Met Arg Thr Leu Arg Gln Lys Gly Gly Leu Ser Gly Phe Thr Lys Arg

100

105

110

Ser Glu Ser Ala Tyr Asp Pro Phe Gly Ala Ala His Ser Ser Thr Ser

115

120

125

Ile Ser Ala Ala Leu Gly Phe Ala Met Gly Arg Glu Leu Gly Gln Pro
130 135 140

Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Ile Gly Asp Gly Ser Ile Thr Ala Gly
145 150 155 160

Met Ala Tyr Glu Ala Leu Asn His Ala Gly His Leu Asn Lys Arg Leu
165 170 175

Phe Val Ile Leu Asn Asp Asn Asp Met Ser Ile Ala Pro Pro Val Gly
180 185 190

Ala Leu Ala Arg Tyr Leu Val Asn Leu Ser Ser Lys Ala Pro Phe Ala
195 200 205

Thr Leu Arg Ala Ala Ala Asp Gly Leu Glu Ala Ser Leu Pro Gly Pro
210 215 220

Leu Arg Asp Gly Ala Arg Arg Ala Arg Gln Leu Val Thr Gly Met Pro
225 230 235 240

Gly Gly Gly Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Thr Tyr Val Gly Pro
245 250 255

Ile Asp Gly His Asp Met Glu Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Ala Ala
260 265 270

Arg Ala Arg Thr Thr Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Lys Lys
275 280 285

Gly Lys Gly Tyr Ala Pro Ala Glu Asn Ala Pro Asp Lys Tyr His Gly
290 295 300

Val Asn Lys Phe Asp Pro Val Thr Gly Glu Gln Lys Lys Ser Val Ala
 305 310 315 320
 Asn Ala Pro Asn Tyr Thr Lys Val Phe Gly Ser Thr Leu Thr Glu Glu
 325 330 335
 Ala Ala Arg Asp Pro Arg Ile Val Ala Ile Thr Ala Ala Met Pro Ser
 340 345 350
 Gly Thr Gly Val Asp Ile Met Gln Lys Arg Phe Pro Asn Arg Val Phe
 355 360 365
 Asp Val Gly Ile Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu
 370 375 380
 Ala Gly Ala Gly Met Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Leu
 385 390 395 400
 Gln Arg Gly Tyr Asp Gln Ile Ala His Asp Val Ala Leu Gln Asn Leu
 405 410 415
 Pro Val Arg Phe Val Ile Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly
 420 425 430
 Ala Thr His Ala Gly Ala Phe Asp Val Gly Phe Leu Thr Ser Leu Pro
 435 440 445
 Asn Met Thr Val Met Ala Ala Ala Asp Glu Ala Glu Leu Ile His Met
 450 455 460
 Ile Ala Thr Ala Val Ala Phe Asp Glu Gly Pro Ile Ala Phe Arg Phe
 465 470 475 480

Pro Arg Gly Glu Gly Val Gly Val Glu Met Pro Glu Arg Gly Thr Val
 485 490 495

Leu Glu Pro Gly Arg Gly Arg Val Val Arg Glu Gly Thr Asp Val Ala
 500 505 510

Ile Leu Ser Phe Gly Ala His Leu His Glu Ala Leu Gln Ala Ala Lys
 515 520 525

Leu Leu Glu Ala Glu Gly Val Ser Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe
 530 535 540

Ser Arg Pro Leu Asp Thr Gly Leu Ile Asp Gln Leu Val Arg His His
 545 550 555 560

Ala Ala Leu Val Thr Val Glu Gln Gly Ala Met Gly Gly Phe Gly Ala
 565 570 575

His Val Met His Tyr Leu Ala Asn Ser Gly Gly Phe Asp Gly Gly Leu
 580 585 590

Ala Leu Arg Val Met Thr Leu Pro Asp Arg Phe Ile Glu Gln Ala Ser
 595 600 605

Pro Glu Asp Met Tyr Ala Asp Ala Gly Leu Arg Ala Glu Asp Ile Ala
 610 615 620

Ala Thr Ala Arg Gly Ala Leu Ala Arg Gly Arg Val Met Pro Leu Arg
 625 630 635 640

Gln Thr Ala Lys Pro Arg Ala Val
 645

<210> 29

<211> 1944

<212> DNA

<213> Rhodobacter sphaeroides

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1944)

<400> 29

atg acc aat ccc acc ccg cga ccc gaa acc ccg ctt ttg gat cgc gtc	48
Met Thr Asn Pro Thr Pro Arg Pro Glu Thr Pro Leu Leu Asp Arg Val	
1 5 10 15	
tgc tgc ccg gcc gac atg aag gcg ctg agt gac gcc gaa ctg gag cgg	96
Cys Cys Pro Ala Asp Met Lys Ala Leu Ser Asp Ala Glu Leu Glu Arg	
20 25 30	
ctg gcc gac gaa gtg cgt tcc gag gtg att tcg gtc gtt gcc gag acg	144
Leu Ala Asp Glu Val Arg Ser Glu Val Ile Ser Val Val Ala Glu Thr	
35 40 45	
gga gga cat ctg ggg tcc tcg ctg ggg gtg gtc gag ctg acc gtc gcg	192
Gly Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala	
50 55 60	
ctg cat gca gtc ttc aac acg ccc acc gac aag ctc gtc tgg gac gtg	240
Leu His Ala Val Phe Asn Thr Pro Thr Asp Lys Leu Val Trp Asp Val	
65 70 75 80	
ggc cac cag tgc tac ccc cac aag atc ctc acc ggc cgg cgc gag cag	288

64/75

Thr Leu Arg Ala Ala Ala Asp Gly Leu Glu Ala Ser Leu Pro Gly Pro
 210 215 220

ctc cgc gac ggg gcg cgc cgg gcg cgc cag ctc gtg acc ggg atg ccg 720
 Leu Arg Asp Gly Ala Arg Arg Ala Arg Gln Leu Val Thr Gly Met Pro
 225 230 235 240

ggc ggg ggc acg ctc ttc gag gag ctg ggc ttc acc tat gtg ggt ccc 768
 Gly Gly Gly Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Thr Tyr Val Gly Pro
 245 250 255

atc gac ggc cac gac atg gag gcg ctg ctc cag acg ctg cgc gcg gcg 816
 Ile Asp Gly His Asp Met Glu Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Ala Ala
 260 265 270

cgg gcc cgg acc acg ggg ccg gtg ctc atc cat gtg gtc acg aag aag 864
 Arg Ala Arg Thr Thr Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Lys Lys
 275 280 285

ggc aag ggc tac gcc cct gcc gag aat gcc ccc gac aag tat cac ggg 912
 Gly Lys Gly Tyr Ala Pro Ala Glu Asn Ala Pro Asp Lys Tyr His Gly
 290 295 300

gtg aac aag ttc gac ccc gtc acg ggc gag cag aag aag tcg gtc gcc 960
 Val Asn Lys Phe Asp Pro Val Thr Gly Glu Gln Lys Lys Ser Val Ala
 305 310 315 320

aac gcg ccg aac tac acc aag gtc ttc ggc tcc acc ctg acc gag gag 1008
 Asn Ala Pro Asn Tyr Thr Lys Val Phe Gly Ser Thr Leu Thr Glu Glu
 325 330 335

gcc gcg cgc gat ccg cgc atc gtg gcc atc acc gcg gcc atg ccc tcg 1056

Ala Ala Arg Asp Pro Arg Ile Val Ala Ile Thr Ala Ala Met Pro Ser
340 345 350

ggc acc ggc gtc gac atc atg cag aag cgt ttc ccg aac cgc gtc ttc 1104
Gly Thr Gly Val Asp Ile Met Gln Lys Arg Phe Pro Asn Arg Val Phe
355 360 365

gac gtg ggc atc gcc gag cag cat gcc gtg acc ttc gcg gcg ggc ctt 1152
Asp Val Gly Ile Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu
370 375 380

gcc ggg gcc ggg atg aag ccc ttc tgc gcg atc tat tcc tcg ttc ctg 1200
Ala Gly Ala Gly Met Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Leu
385 390 395 400

caa cgg ggc tac gac cag atc gcc cat gac gtg gcg ctg cag aac ctt 1248
Gln Arg Gly Tyr Asp Gln Ile Ala His Asp Val Ala Leu Gln Asn Leu
405 410 415

ccc gtc cgc ttc gtg atc gac cgg gcg ggg ctc gtg ggg gcc gac ggt 1296
Pro Val Arg Phe Val Ile Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly
420 425 430

gcg acc cat gcg ggg gcc ttc gat gtg ggc ttc ctc acg tcg ctg ccc 1344
Ala Thr His Ala Gly Ala Phe Asp Val Gly Phe Leu Thr Ser Leu Pro
435 440 445

aat atg acc gtg atg gcc gcg gcc gac gag gcc gag ctc atc cac atg 1392
Asn Met Thr Val Met Ala Ala Ala Asp Glu Ala Glu Leu Ile His Met
450 455 460

atc gcc acc gcc gtg gcc ttc gac gag ggc ccc att gcc ttc cgc ttc 1440

Ile Ala Thr Ala Val Ala Phe Asp Glu Gly Pro Ile Ala Phe Arg Phe	
465	470 475 480
ccg cgg ggc gag ggg gtg ggc gtc gag atg ccc gag cgc ggg acc gtg	1488
Pro Arg Gly Glu Gly Val Gly Val Glu Met Pro Glu Arg Gly Thr Val	
	485 490 495
ctg gaa ccc ggc cgg ggc cgc gtg gtg cgc gag ggg acg gat gtg gcg	1536
Leu Glu Pro Gly Arg Gly Arg Val Val Arg Glu Gly Thr Asp Val Ala	
	500 505 510
atc ctt tcc ttc ggc gcg cat ctg cac gag gcc ttg cag gcg gcg aaa	1584
Ile Leu Ser Phe Gly Ala His Leu His Glu Ala Leu Gln Ala Ala Lys	
	515 520 525
ctc ctc gag gcc gag ggg gtg agc gtg acc gtg gcc gac gcc cgc ttc	1632
Leu Leu Glu Ala Glu Gly Val Ser Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe	
	530 535 540
tcg cgc ccg ctc gac acg ggg ctc att gac cag ctc gtg cgc cat cac	1680
Ser Arg Pro Leu Asp Thr Gly Leu Ile Asp Gln Leu Val Arg His His	
	545 550 555 560
gcc gcg ctg gtg acg gtg gag cag ggg gcc atg ggc ggc ttc ggc gct	1728
Ala Ala Leu Val Thr Val Glu Gln Gly Ala Met Gly Gly Phe Gly Ala	
	565 570 575
cat gtc atg cac tat ctc gcc aat tcc ggc ggc ttc gac ggg ggc ctc	1776
His Val Met His Tyr Leu Ala Asn Ser Gly Gly Phe Asp Gly Gly Leu	
	580 585 590
gcg ctc cgg gtc atg acg ctg ccc gac cgc ttc atc gag cag gcg agc	1824

Ala Leu Arg Val Met Thr Leu Pro Asp Arg Phe Ile Glu Gln Ala Ser
 595 600 605 -

ccc gag gac atg tat gcc gat gcg ggg ctg cgg gcc gag gat atc gcg 1872
 Pro Glu Asp Met Tyr Ala Asp Ala Gly Leu Arg Ala Glu Asp Ile Ala
 610 615 620

gcc acc gcg cgg ggc gcg ctc gcc cgg ggg cgc gtg atg ccg ctc cgg 1920
 Ala Thr Ala Arg Gly Ala Leu Ala Arg Gly Arg Val Met Pro Leu Arg
 625 630 635 640

cag acg gca aag ccg cgg gcg gtc 1944
 Gln Thr Ala Lys Pro Arg Ala Val
 645

<210> 30

<211> 394

<212> PRT

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 30

Met Arg Ser Leu Ser Ile Phe Gly Ala Thr Gly Ser Ile Gly Glu Ser
 1 5 10 15

Thr Phe Asp Leu Val Met Arg Lys Gly Gly Pro Glu Ala Phe Arg Thr
 20 25 30

Val Ala Leu Thr Gly Gly Arg Asn Ile Arg Arg Leu Ala Glu Met Ala
 35 40 45

Arg Ala Leu Lys Ala Glu Leu Ala Val Thr Ala His Glu Asp Cys Leu

50	55	60
Pro Ala Leu Arg Glu Ala Leu Ala Gly Thr Gly Thr Glu Val Ala Gly		
65	70	75 80
Gly Ala Gln Ala Ile Ala Glu Ala Ala Asp Arg Pro Ala Asp Trp Thr		
	85	90 95
Met Ser Ala Ile Val Gly Ala Ala Gly Leu Val Pro Gly Met Arg Ala		
100	105	110
Leu Lys His Gly Arg Thr Leu Ala Leu Ala Asn Lys Glu Ser Leu Val		
115	120	125
Thr Ala Gly Gln Leu Leu Met Arg Thr Ala Gln Glu Asn Gly Ala Thr		
130	135	140
Ile Leu Pro Val Asp Ser Glu His Ser Ala Val Phe Gln Ala Leu Ala		
145	150	155 160
Gly Glu Asp Thr Ala Cys Val Glu Arg Val Ile Ile Thr Ala Ser Gly		
	165	170 175
Gly Pro Phe Arg Asp Trp Ser Leu Glu Arg Ile Arg Ala Cys Thr Val		
180	185	190
Ala Glu Ala Gln Ala His Pro Asn Trp Ser Met Gly Gln Arg Ile Ser		
195	200	205
Ile Asp Ser Ala Ser Met Phe Asn Lys Ala Leu Glu Leu Ile Glu Thr		
210	215	220
Arg Glu Phe Phe Gly Phe Glu Pro Asp Arg Ile Glu Ala Val Val His		

225	230	235	240
Pro Gln Ser Ile Val His Ala Met Val Gly Phe Cys Asp Gly Gly Leu			
245	250	255	
Met Ala His Leu Gly Pro Ala Asp Met Arg His Ala Ile Gly Phe Ala			
260	265	270	
Leu Asn Trp Pro Gly Arg Gly Glu Val Pro Val Ala Arg Ile Asp Leu			
275	280	285	
Ala Gln Ile Ala Ser Leu Thr Phe Gln Lys Pro Asp Glu Glu Arg Phe			
290	295	300	
Pro Ala Leu Arg Leu Ala Arg Asp Val Met Ala Ala Arg Gly Leu Ser			
305	310	315	320
Gly Ala Ala Phe Asn Ala Ala Lys Glu Ile Ala Leu Asp His Phe Ile			
325	330	335	
Ala Gly Arg Ile Gly Phe Leu Asp Met Ala Ala Val Val Glu Glu Thr			
340	345	350	
Leu Ala Gly Val Ser Thr Asp Pro Leu Phe Gly Lys Val Pro Asp Ala			
355	360	365	
Leu Glu Glu Val Leu Ala Met Asp His Leu Ala Arg Arg Ala Ala Glu			
370	375	380	
Glu Ala Ala Gly Leu Arg Gln Gln Lys Arg			
385	390		

<210> 31

<211> 1182

<212> DNA

<213> Rhodobacter sphaeroides

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1182)

<400> 31

```

atg cgc agc ctg tcg atc ttt ggg gcc acc ggc tcc atc ggc gaa tcc 48
Met Arg Ser Leu Ser Ile Phe Gly Ala Thr Gly Ser Ile Gly Glu Ser
  1             5             10             15

acc ttc gac ctc gtc atg cgg aag ggc ggg ccc gag gcg ttc cgc acc 96
Thr Phe Asp Leu Val Met Arg Lys Gly Gly Pro Glu Ala Phe Arg Thr
      20             25             30

gtc gct ctg acc ggc ggg cgc aac atc cgg cga ctg gcc gaa atg gcg 144
Val Ala Leu Thr Gly Gly Arg Asn Ile Arg Arg Leu Ala Glu Met Ala
      35             40             45

cgt gcg ctg aag gcg gag ctt gcc gtc acc gcg cat gag gac tgc ctg 192
Arg Ala Leu Lys Ala Glu Leu Ala Val Thr Ala His Glu Asp Cys Leu
      50             55             60

ccc gcg ctg cgc gag gcg ctg gcc ggg acg ggc acc gag gtc gcg ggc 240
Pro Ala Leu Arg Glu Ala Leu Ala Gly Thr Gly Thr Glu Val Ala Gly
      65             70             75             80

ggg gcg cag gcc atc gcc gag gcc gcc gac cgg ccg gcc gac tgg acc 288

```

Gly Ala Gln Ala Ile Ala Glu Ala Ala Asp Arg Pro Ala Asp Trp Thr
 85 90 95

 atg tcg gcc atc gtg ggc gcc gcg ggc ctc gtg ccc gga atg cgg gcg 336
 Met Ser Ala Ile Val Gly Ala Ala Gly Leu Val Pro Gly Met Arg Ala
 100 105 110

 ctg aag cac ggc cgc acg ctg gcg ctc gcc aac aag gaa agc ctc gtg 384
 Leu Lys His Gly Arg Thr Leu Ala Leu Ala Asn Lys Glu Ser Leu Val
 115 120 125

 acg gca ggg caa ctc ctg atg cgg acg gcc cag gag aac ggc gcc acg 432
 Thr Ala Gly Gln Leu Leu Met Arg Thr Ala Gln Glu Asn Gly Ala Thr
 130 135 140

 atc ctg ccg gtg gac agc gag cac tcc gcg gtc ttt cag gcg ctg gcg 480
 Ile Leu Pro Val Asp Ser Glu His Ser Ala Val Phe Gln Ala Leu Ala
 145 150 155 160

 ggc gag gac acg gcc tgc gtc gag cgc gtc atc atc acg gcg tcc ggc 528
 Gly Glu Asp Thr Ala Cys Val Glu Arg Val Ile Ile Thr Ala Ser Gly
 165 170 175

 ggg ccg ttc cgc gac tgg agc ctc gag cgc atc cgc gcc tgc acc gtg 576
 Gly Pro Phe Arg Asp Trp Ser Leu Glu Arg Ile Arg Ala Cys Thr Val
 180 185 190

 gcc gag gcg cag gcc cat ccc aac tgg tcc atg ggc cag cgg atc tcc 624
 Ala Glu Ala Gln Ala His Pro Asn Trp Ser Met Gly Gln Arg Ile Ser
 195 200 205

 atc gac agc gcc tcg atg ttc aac aag gcg ctc gag ctg atc gag acg 672

Ile Asp Ser Ala Ser Met Phe Asn Lys Ala Leu Glu Leu Ile Glu Thr
 210 215 220
 cgc gaa ttc ttc ggc ttc gag ccg gac cgg atc gag gcg gtc gtc cat 720
 Arg Glu Phe Phe Gly Phe Glu Pro Asp Arg Ile Glu Ala Val Val His
 225 230 235 240
 ccg caa tcc atc gtc cat gcg atg gtg ggc ttc tgc gac ggg ggc ctg 768
 Pro Gln Ser Ile Val His Ala Met Val Gly Phe Cys Asp Gly Gly Leu
 245 250 255
 atg gcc cat ctc ggc ccc gcc gac atg cgc cac gcc atc gga ttc gcg 816
 Met Ala His Leu Gly Pro Ala Asp Met Arg His Ala Ile Gly Phe Ala
 260 265 270
 ctg aac tgg ccg ggt cgc ggc gag gtg ccc gtc gcc cgg atc gac ctc 864
 Leu Asn Trp Pro Gly Arg Gly Glu Val Pro Val Ala Arg Ile Asp Leu
 275 280 285
 gca cag att gcg agc ctc acc ttc cag aag cct gac gag gaa cgc ttt 912
 Ala Gln Ile Ala Ser Leu Thr Phe Gln Lys Pro Asp Glu Glu Arg Phe
 290 295 300
 ccg gcc ctg agg ctt gcg cga gac gtc atg gcg gcg cgc ggc ctg tcg 960
 Pro Ala Leu Arg Leu Ala Arg Asp Val Met Ala Ala Arg Gly Leu Ser
 305 310 315 320
 ggc gcc gcc ttc aac gcg gcc aag gag atc gcg ctc gat cat ttc atc 1008
 Gly Ala Ala Phe Asn Ala Ala Lys Glu Ile Ala Leu Asp His Phe Ile
 325 330 335
 gcc gga cgc atc ggg ttt ctg gac atg gcg gcg gtg gtc gag gag acg 1056

Ala Gly Arg Ile Gly Phe Leu Asp Met Ala Ala Val Val Glu Glu Thr

340

345

350

ctc gcg ggc gtt tcg acc gac ccc ctg ttc gga aaa gtg ccc gac gcc 1104

Leu Ala Gly Val Ser Thr Asp Pro Leu Phe Gly Lys Val Pro Asp Ala

355

360

365

ctt gag gaa gtg ctg gcc atg gac cat ctc gct cgg aga gcg gca gag 1152

Leu Glu Glu Val Leu Ala Met Asp His Leu Ala Arg Arg Ala Ala Glu

370

375

380

gaa gcc gcc ggt ctc cgc cag cag aaa agg

1182

Glu Ala Ala Gly Leu Arg Gln Gln Lys Arg

385

390

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 32

aagctgatct gggacgtggg gca

23

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 33

tgctatccgc acaagatcct gac

23

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 34

gcatgctgtt ccgcgatgcc gac

23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01987

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/52, C12P23/00, C12N9/00, 9/10, A01N57/18, C12Q1/25, 1/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/52-15/61, C12P23/00, C12N9/00-9/99, A01N57/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	Biochemical Journal, Volume 295, part 2, issued October 15, 1993, Michel Rohmer et al., "Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate", pages 517-524	1-3, 6, 7, 9 4, 5, 8, 10-22
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Volume 94, Number 24, issued November 25, 1997, Georg A. Sprenger et al., "Identification of a thiamin-dependent synthase in Escherichia coli required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol", pages 12857-12862	1-3, 9
X Y A	Journal of Biochemistry, Volume 108, Number 6, issued December, 1990, Shingo Fujisaki et al., "Cloning and Nucleotide Sequence of the ispA Gene Responsible for Farnesyl Diphosphate Synthase Activity in Escherichia coli", pages 995-1000	10-13 4, 5, 9 8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 July, 1999 (13. 07. 99)

Date of mailing of the international search report
3 August, 1999 (03. 08. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01987

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Science, Volume 277, issued September 5, 1997, Frederick R. Blattner et al., "The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12", pages 1453-1474 & Database GenBank, Accession No. AE000148 & Database SwissProt, Accession No. P77735	10-13 8
Y	"Kouso Handbook", supervised by Fumiharu Maruo, first edition, December 1, 1982, K.K. Asakura Shoten, p.303	4, 5, 9
PX PY	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Volume 95, Number 17, issued August 18, 1998, Shunji Takahashi et al., "A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis", pages 9879-9884	10-13 1, 6, 7, 9
X	Journal of Bacteriology, Volume 174, Number 23, issued December, 1992, Kunitoshi Yamanaka et al., "Identification and Characterization of the smbA Gene, a Suppressor of the mukB Null Mutant of Escherichia coli", pages 7517-7526	10-13
PX	Zeitschrift fur Naturforschung Section C, Journal of Biosciences, Volume 53, Numbers 11-12, issued 1998, Johannes Zeidler et al., "Inhibition of the Non-Mevalonate 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Pathway of Plant Isoprenoid Biosynthesis by Fosmidomycin", pages 980-986	14-22
A	WO, 97/43437, A2 (The University of Sheffield), 20 November, 1997 (20. 11. 97) & AU, 9727833, A	14-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01987

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The requirement of unity of invention (Rule 13.1 of the Regulations under the PCT) is not satisfied unless a group of inventions as set forth in claims have technical relationship to each other involving one or more of the same or corresponding special technical features. The term "special technical feature" means a technical feature which clearly indicates that the inventions as set forth in claims contribute, as the whole, to the prior art (Rule 13.2 of the Regulations under the PCT). The requirement of unity of invention is judged without considering whether a group of inventions is described in separate claims or in one claim in the alternative form (Rule 13.3 of the Regulations under the PCT).

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01987

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

With respect to the claims of the present application, inventions as set forth in claims 1 to 9 and 12 (in the part wherein the description of claim 1 is cited) have a technical matter in common of elevating the productivity of isoprenoid compounds by a genetic engineering means with the use of a DNA encoding an enzyme on the non-mevalonate pathway, etc., while inventions as set forth in claims 14 to 22 have a technical matter in common that substances inhibiting the enzymatic activity in the non-mevalonate pathway inhibit the growth of microorganisms and plants having this pathway. However, it is needless to say that the non-mevalonate pathway has been publicly known. Similarly, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase as an enzyme on the non-mevalonate pathway and DNA encoding the same have been publicly known (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(24), 12857-12862 (1997)). Accordingly, it can be concluded that there is no "special technical feature" in common among the inventions as set forth in claims 1 to 9 and 12 (in the part wherein the description of claim 1 is cited) and the inventions as set forth in claims 14 to 22.

In the following descriptions given claims 10, 11, 12 (in the part wherein the description of claim 11 is cited) and 13:

① invention relating to a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:3 or a DNA having a base sequence represented by SEQ ID NO:8;

② invention relating to a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:4 or a DNA having a base sequence represented by SEQ ID NO:9; and

③ invention relating to a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:5 or a DNA having a base sequence represented by SEQ ID NO:10;

have a technical matter in common of being proteins capable of elevating the efficiency of synthesizing isoprenoid compounds or being DNAs encoding the same. Since it is obvious that the above-mentioned publicly known enzyme 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase is one of the proteins capable of elevating the efficiency of synthesizing isoprenoid compounds, being proteins capable of elevating the efficiency of synthesizing isoprenoid compounds or being gDNAs encoding the same cannot be regarded as any "special technical feature". Moreover, there is no "special technical feature" in common between these groups of the inventions ① to ③ and the inventions as set forth in claims 1 to 9 and 12 (in the part wherein the description of claim 1 is cited) or those as set forth in claims 14 to 22.

Such being the case, the inventions as set forth in the claims involve five inventions as specified below:

(1) the invention as set forth in claims 1 to 9 and 12 (in the part wherein the description of claim 1 is cited);

(2) the invention as set forth in claims 10, 11, 12 (in the part wherein the description of claim 11 is cited) and 13 relating to a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:3 or a DNA having the base sequence represented by SEQ ID NO:8;

(3) the invention as set forth in claims 10, 11, 12 (in the part wherein the description of claim 11 is cited) and 13 relating to a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:4 or a DNA having the base sequence represented by SEQ ID NO:9;

(4) the invention as set forth in claims 10, 11, 12 (in the part wherein the description of claim 11 is cited) and 13 relating to a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:5 or a DNA having the base sequence represented by SEQ ID NO:10; and

(5) the invention as set forth in claim 14 to 22.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl[°] C12N15/52, C12P23/00, C12N9/00, 9/10, A01N57/18,
C12Q1/25, 1/48

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl[°] C12N15/52-15/61, C12P23/00, C12N9/00-9/99,
A01N57/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	Biochemical Journal, Volume 295, part 2, issued October 15, 1993, Michel Rohmer et al., "Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate", pages 517-524	1-3, 6, 7, 9 4, 5, 8, 10-22
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Volume 94, Number 24, issued November 25, 1997, Georg A. Sprenger et al., "Identification of a thiamin-dependent synthase in Escherichia coli required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol", pages 12857-12862	1-3, 9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.07.99

国際調査報告の発送日

03.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4N

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	Journal of Biochemistry, Volume 108, Number 6, issued December, 1990, Shingo Fujisaki et al., "Cloning and Nucleotide Sequence of the ispA Gene Responsible for Farnesyl Diphosphate Synthase Activity in Escherichia coli", pages 995 -1000	10-13 4, 5, 9 8
X A	Science, Volume 277, issued September 5, 1997, Frederick R. Blattner et al., "The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12", pages 1453-1474 & Database GenBank, Accession No. AE000148 & Database SwissProt, Accession No. P77735	10-13 8
Y	丸尾文治外1名監修「酵素ハンドブック」初版, 1982年12月1日, 株式会社朝倉書店, p. 303	4, 5, 9
P X P Y	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Volume 95, Number 17, issued August 18, 1998, Shunji Takahashi et al., "A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis", pages 9879-9884	10-13 1, 6, 7, 9
X	Journal of Bacteriology, Volume 174, Number 23, issued December, 1992, Kunitoshi Yamanaka et al., "Identification and Characterization of the smbA Gene, a Suppressor of the mukB Null Mutant of Escherichia coli", pages 7517-7526	10-13
P X	Zeitschrift fur Naturforschung Section C, Journal of Bio-sciences, Volume 53, Numbers 11-12, issued 1998, Johannes Zeidler et al., "Inhibition of the Non-Mevalonate 1-Deoxy-D-xylulose-5- phosphate Pathway of Plant Isoprenoid Biosynthesis by Fosmidomycin", pages 980-986	14-22
A	WO, 97/43437, A2 (The University of Sheffield) 20.11月.1997 (20.11.97) & AU, 9727833, A	14-22

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

国際出願における発明の単一性の要件 (PCT規則13.1) は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的關係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである (PCT規則13.2)。また、発明の単一性の要件の判断は、一群の発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に択一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われる (PCT規則13.3)。

そこで、請求の範囲をみると、請求の範囲1-9及び12 (請求の範囲1を引用した部分

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第II欄の続き

)の発明に共通の事項は、非メバロン酸経路上の酵素等をコードするDNAを用いた遺伝子工学的手法によりイソプレノイド化合物の生産性を向上させることであり、請求の範囲14-22の発明に共通の事項は、非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質が、該経路を有する微生物及び植物の生育を阻害することである。しかしながら、非メバロン酸経路はいまでもなく公知のものであるし、該経路上の酵素として1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸合成酵素及びそれをコードするDNAが公知である(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(24), 12857-12862 (1997))。そうすると、請求の範囲1-9及び12(請求の範囲1を引用した部分)の発明と請求の範囲14-22の発明に共通する「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

また、請求の範囲10, 11, 12(請求の範囲11を引用した部分)及び13中の、
① 配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質又は配列番号8記載の塩基配列を有するDNAに関連した発明、
② 配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質又は配列番号9記載の塩基配列を有するDNAに関連した発明、及び、
③ 配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質又は配列番号10記載の塩基配列を有するDNAに関連した発明
に共通する事項は、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質又はそれをコードするDNAであるが、上記公知の1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸合成酵素は、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質の一種であることは明らかであるから、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質又はそれをコードするDNAは「特別な技術的特徴」であるとはいえない。そして、これら①-③の発明と、請求の範囲1-9及び12(請求の範囲1を引用した部分)の発明又は請求の範囲14-22の発明との間にも、共通する「特別な技術的特徴」は存在しない。

そうすると、請求の範囲には、

- (1) 請求の範囲1-9及び12(請求の範囲1を引用した部分)の発明、
 - (2) 請求の範囲10, 11, 12(請求の範囲11を引用した部分)及び13中の、配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質又は配列番号8記載の塩基配列を有するDNAに関連した発明、
 - (3) 請求の範囲10, 11, 12(請求の範囲11を引用した部分)及び13中の、配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質又は配列番号9記載の塩基配列を有するDNAに関連した発明
 - (4) 請求の範囲10, 11, 12(請求の範囲11を引用した部分)及び13中の、配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質又は配列番号10記載の塩基配列を有するDNAに関連した発明、及び、
 - (5) 請求の範囲14-22の発明
- の5発明が包含されている。